

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Madrid 1996



* 5 3 0 9 6 0 7 2 6 5 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

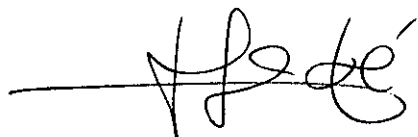
Efectos del estrés crónico y de la actividad
glucocorticoide sobre el crecimiento: modificaciones
en el esqueleto craneal
de la rata

María José González Abad



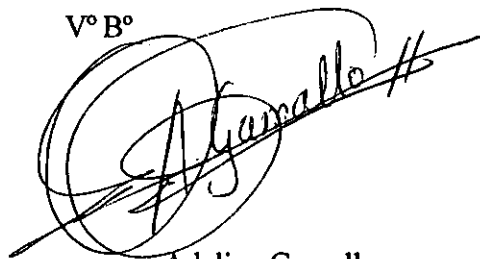
ARCHIVO

María José González-Abad

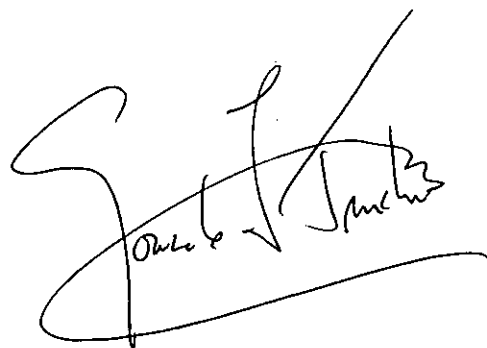
A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line followed by stylized, cursive letters.

Los Directores

Vº Bº

A handwritten signature in black ink, featuring a large, circular flourish on the left and the name 'Gamallo' written in a cursive script.

Adelina Gamallo

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'G' on the left and the name 'Tranco' written in a cursive script.

Gonzalo J. Tranco

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal II (Fisiología) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Dres. Adelina Gamallo Amat y Gonzalo Javier Tranco Gayo, Profesores Titulares de Universidad.

Siempre desee llegar a esta parte porque pensaba que supondría el final de un trabajo que ha resultado muy duro y, en ocasiones, desesperante. Ahora que escribo estas palabras la verdad es que los momentos difíciles ya no lo parecen tanto y hasta me atrevería a pensar que han sido ellos los que me han ayudado a proseguir y los que han forjado el carácter de este trabajo.

Nadie sabe tanto de esto como mi Directora, la Profesora Adelina Gamallo Amat, la persona que ha estado en todo momento a mi lado. Ella ha sido la que me ha forjado a mí, la que con cuidado, pero firmemente, me ha ido dando forma y la que ha sido tan inteligente como para hacerlo sin pretender cambiarme. Gracias, Chiky, por tu valía profesional y personal, esta Tesis te la dedico especialmente a ti, a una mujer "de bandera" de la que me siento orgullosa de tener por **MAESTRA**.

Mi sincero agradecimiento a mi Director, el Profesor Gonzalo Trancho Gayo, quién me ha aportado reflexión y lucidez en los momentos de duda. Quién me ha hecho recapacitar más de una vez y ha calmado mis nervios con su paciencia infinita. Gracias por tu experiencia y por tu asesoramiento en este trabajo. También por interceder entre la Informática y yo (es público que no nos llevamos nada bien).

El más grato de los recuerdos para mi compañero, el Dr. Pedro Alario, porque siempre he contado con tu ayuda. Por el trabajo y los buenos ratos que hemos compartido, que no te imaginas lo mucho que he echado de menos. Asimismo, quiero agradecer a mi compañera Elena Sánchez su sonrisa y buen humor en todos los momentos que pasamos juntas.

A Inmaculada López le agradezco su "insistencia" conmigo a pesar de que a veces no soy demasiado sociable. Gracias por brindarme tu amistad, por tu interés y consuelo siempre que lo he necesitado.

Mi agradecimiento a todos los integrantes del Departamento de Biología Animal II (Fisiología), por su cariñosa acogida cuando entré a formar parte de ellos y, posteriormente, por su compañerismo y trato afable. Particularmente, a las Profesoras Mercedes Alonso, Mónica de la Fuente y Rosa M^a Arahuetes, quienes como directoras del

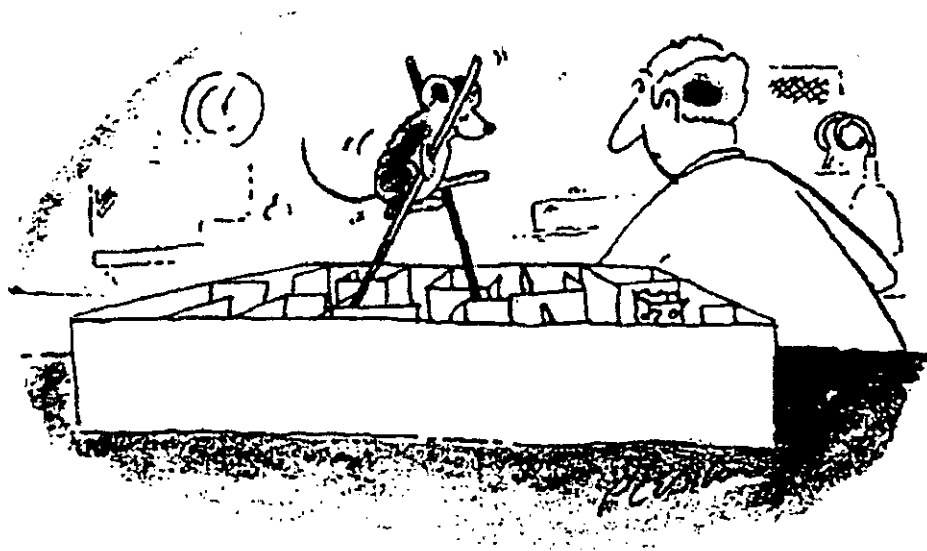
Departamento, desde mi incorporación, siempre me proporcionaron ayuda.

Deseo agradecer a la Profesora M^a Paz Nava sus desvelos por mí y su constante seguimiento de la marcha de este trabajo. Yo también he podido observar de cerca tu dedicación y esfuerzo. Gracias por tu ejemplo.

A la Profesora M^a Angeles Villanúa quiero agradecerla su interés por mi trabajo y el cariño que siempre me ha demostrado y, especialmente, el que profesa a una persona muy cercana.

A mis padres y a mi hermana, que todavía no se lo creen, les agradezco absolutamente TODO. No hay palabras y si un millón de besos.

Bueno, Gonzalo, sólo quedas tú. Te he dejado para el final porque a ti te debo los *peores momentos* de esta Tesis. Pero como ya dije al principio, esos son los mejores. Tú me entiendes. GRACIAS.



INDICE

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

I. INTRODUCCION	1
1. Estrés crónico y Síndrome General de Adaptación	1
1.1. Activación del eje HHA por el estrés	6
1.2. Características funcionales de los glucocorticoides	13
1.2.1. Efectos fisiológicos	16
1.2.2. Acciones farmacológicas: dexametasona	20
1.3. Efectos de la activación del eje HHA sobre los sistemas nervioso, endocrino e inmune	21
2. Crecimiento y desarrollo óseo	28
2.1. Componentes y estructura del tejido óseo	28
2.2. Desarrollo, patrones de crecimiento y metabolismo óseo	32
2.3. Acción muscular sobre el metabolismo óseo	36
2.4. Regulación endocrina del metabolismo mineral en el hueso	38
2.4.1. Efectos de la parathormona y de la vitamina D	41
2.4.2. Regulación por calcitonina	43
2.4.3. Participación de hormonas no directamente relacionadas con el metabolismo mineral.	44
2.5. Efectos ambientales sobre el metabolismo del hueso: estrés y alteraciones óseas	47
II. ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO: justificación del diseño experimental	58
1. Referente al animal	58
2. Referente a los órganos	61
3. Referente al esqueleto	63

III. METODOLOGIA	68
1. Material biológico	68
2. Diseño experimental	69
2.1. Tratamientos	69
2.2. Procedimiento	70
2.3. Parámetros a estudiar	70
3. Obtención de muestras biológicas de los animales	71
3.1. Muestras de sangre y plasma	71
3.2. Muestras de órganos y cráneos	72
4. Estudio del desarrollo de los órganos	72
5. Técnica craneométrica	73
6. Técnicas analíticas	79
6.1. Valoración de corticosterona plasmática	79
6.1.1. Reactivos específicos	79
6.1.2. Extracción de corticosterona	80
6.1.3. Reacción antígeno-anticuerpo	81
6.1.4. Separación de las fracciones ligada y libre	82
6.1.5. Características del RIA	83
6.2. Valoración de ácidos nucleicos	83
6.2.1. Reactivos específicos	83
6.2.2. Extracción de los ácidos nucleicos	84
6.2.3. Valoración de ADN	84
6.3. Valoración de proteínas totales	85
6.3.1. Reactivos específicos	85
6.3.2. Determinación de proteínas	86
6.4. Valoración de los constituyentes minerales del hueso	86
6.4.1. Preparación de las muestras	87
6.4.2. Determinación de macro y microconstituyentes	87
6.4.2.1. Patrones para la determinación de macroconstituyentes	88
6.4.2.2. Patrones para la determinación de microconstituyentes	89
6.4.2.3. Cálculo de concentraciones de las soluciones interferentes	89
7. Análisis estadístico	90
7.1. Estadística descriptiva	90
7.2. Test estadísticos	90
7.2.1. Análisis univariante	90
7.2.2. Análisis multivariante	91

ANEXO I. Reactivos específicos, hormonas y anticuerpos	92
ANEXO II. Aparatos	93
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	94
1. Actividad adrenal	94
1.1. Niveles de corticosterona plasmática	95
2. Crecimiento y desarrollo de los animales	99
2.1. Ganancia de peso acumulada y evolución temporal de la ganancia de peso corporal	99
2.2. Modificaciones en la distribución de la grasa subcutánea	103
2.3. Posibles efectos de la ingesta de comida	107
2.4. Dimensiones corporales	113
3. Alteraciones del desarrollo de los órganos	119
3.1. Alteraciones en el peso de los órganos y su incidencia en el peso corporal	120
3.2. Alteraciones en el crecimiento de los órganos	129
4. Craneometría	148
4.1. Variables craneométricas e índices: estudio univariante	148
4.2. Estadística multivariante de las variables craneométricas	186
4.2.1. Análisis factorial: análisis de componentes principales	187
4.2.2. Análisis discriminante	210
5. Alteraciones en el contenido de macro y microconstituyentes del hueso	217
5.1. Constituyentes minerales	217
5.2. Estadística multivariante de los constituyentes minerales del hueso	237
5.2.1. Análisis factorial: análisis de componentes principales	238
V. DISCUSION GLOBAL	249
VI. CONCLUSIONES	261
VII. BIBLIOGRAFIA	265

ABREVIATURAS

ACTH:	Hormona adrenocorticotropa.
ADN:	Acido deoxirribonucleico.
AMPc:	3'- 5'Adenosin monofosfato ciclico.
ARN:	Acido ribonucleico.
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero.
At:	Tubos de actividad total del RIA.
ATP:	Adenosin trifosfato.
B0:	Tubos cero del RIA.
BSA:	Albúmina sérica bovina.
CBG:	Globulina transportadora de corticosteroides.
CRH:	Hormona liberadora de corticotropina.
dB:	Decibelio.
dimetilPOPOP:	1,4 di(2-(4-metil 5-fenil-oxazolil)benceno).
dpm:	Desintegraciones por minuto.
ds:	Desviación estándar.
e:	Error estándar.
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético.
FSH:	Hormona estimulante del folículo.
GABA:	Acido gamma-aminobutírico.
GC:	Glucocorticoides.
GH:	Hormona de crecimiento.
GnRH:	Hormona liberadora de gonatropinas.
HHA:	Hipotálamo-hipófisis-adrenal.
HHG:	Hipotálamo-hipófisis-gonadal.
HHT:	Hipotálamo-hipófisis-tiroideo.
Hz:	Herzio.
ICP-AES:	Espectrometría de emisión por plasma de acoplamiento inductivo.
KMO:	Kaiser-Meyer-Olkin.
Il:	Interleuquina.
LH:	Hormona luteinizante.
mmHg:	Milímetros de mercurio.
MIF:	Factor inhibidor de la liberación de MSH.

μCi :	Microcurio.
MSH:	Hormona estimulante del melanocito.
N:	Tubos residuales del RIA.
NADPH:	Nicotín-adenosín-difosfato reducido.
pc:	Peso corporal.
PIF:	Factor inhibidor de la liberación de prolactina.
PPO:	2,5 difenil oxazol.
PRF:	Factor liberador de prolactina.
PRL:	Prolactina.
PTH:	Parathormona.
RIA:	Radioinmunoanálisis.
rpm:	Revoluciones por minuto.
sc:	Inyección subcutánea.
SGA:	Síndrome General de Adaptación.
SNC:	Sistema nervioso central.
SNS:	Sistema nervioso simpático.
TSH:	Hormona estimulante del tiroides.
UI:	Unidades internacionales.
VIP:	Péptido intestinal vasoactivo.
vs:	<i>Versus</i> .
x:	Media aritmética.
W:	Watio.

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1. ESTRES CRONICO Y SINDROME GENERAL DE ADAPTACION

Cuando emprendemos el estudio de un ser vivo, no podemos desligarlo del medio ambiente en el que se encuentra inmerso. Si algo caracteriza a éste es que fluctúa constantemente y en consecuencia los individuos han de estar capacitados para responder a estas fluctuaciones realizando ajustes internos rápidos. Esta necesidad se habría hecho más apremiante para los vertebrados en su adaptación a la vida terrestre ya que las condiciones de este habitat son más rigurosas y variables.

Por otra parte, resulta lógico pensar que una complejidad creciente debe ir acompañada por un incremento paralelo en la sensibilidad de los mecanismos internos de control y de regulación. En este contexto, el ambiente externo comprende numerosos agentes potencialmente perturbadores frente a los cuales no sólo son precisos mecanismos de ajuste rápido del medio interno sino que, además, se hacen imprescindibles aquéllos que permitan la supervivencia del individuo, condicionada tanto por la severidad de dichos agentes como por las interacciones que se establezcan entre estos y la capacidad del individuo para adaptarse y mantener su **homeostasis**. Por consiguiente, se hace necesaria la combinación de respuestas rápidas con mecanismos reguladores a largo plazo, en función no sólo de la naturaleza sino de la duración de la perturbación ambiental.

El concepto de **homeostasis** se debe al fisiólogo **Claude Bernard (Lain Entralgo, 1978)**. Sin embargo, fue **Walter Cannon (1914, 1935)** quién no sólo acuñó el término "homeostasis", sino quién introdujo también la primera definición de estrés como "todo agente capaz de inducir una respuesta en el mecanismo homeostático del cuerpo". Sus experiencias pusieron de manifiesto la importancia del sistema nervioso simpático (SNS) y de la liberación de las catecolaminas meduloadrenales en respuesta a diversos "agentes estresantes", ya sean estos tanto estímulos físicos como sucesos psíquicos o emocionales. Estas catecolaminas eran pues esenciales para desarrollar las estrategias de lucha o de huida

ante las situaciones de emergencia. **Cannon** observó que el grado de respuesta obtenido guardaba una relación proporcional con la intensidad del estímulo estresante hasta un punto por él denominado "nivel crítico de estrés", a partir del cual los mecanismos homeostáticos eran incapaces de restaurar el funcionamiento normal del organismo.

Posteriormente, el endocrinólogo **Hans Selye (1936)** observó la existencia de una respuesta fisiológica más amplia y de índole general frente a situaciones agresivas que abarcaban todos los campos, desde traumatismos y situaciones ambientales adversas, hasta la estimulación social excesiva. Esta respuesta comprendía un conjunto de manifestaciones consistentes preferentemente en la aparición de úlceras gástricas, atrofia de los tejidos del sistema inmune, crecimiento de las glándulas adrenales y disminución de las respuestas reproductivas. **Selye (1961)** tomó prestado de la ingeniería un término para describir esa respuesta: "las ratas padecían tensiones". Se inicia de esta forma el campo de la fisiología del estrés y se vincula la utilización de este término al concepto previo definido por **Cannon**. También **Selye** establece su propia definición de "estrés" como una "respuesta no específica del organismo frente a cualquier estímulo aplicado sobre él"; los estímulos capaces de desarrollar esta respuesta son considerados, en esta definición, como **agentes estresantes**.

El conjunto total de síntomas, consecuencia de la acción de los diversos agentes estresantes, fue definido como **SINDROME GENERAL DE ADAPTACION (SGA)** y su finalidad, como hemos visto, es la de preparar al organismo para contrarrestar los efectos de dichos agentes en una primera fase, y la de desarrollar mecanismos adaptativos que conduzcan a la supervivencia en un segundo nivel. Este último corresponde a las observaciones de **Selye** relativas a una activación del eje hipófisoadrenal, desencadenándose una serie estereotipada de respuestas frente a la liberación de las hormonas corticoadrenales (**Selye, 1946**).

Sin embargo, el SGA comprende en total tres fases. La primera corresponde a la **REACCION DE ALARMA**, ya descrita por **Cannon**, cuya causa es una estimulación simpática generalizada y mantenida a corto plazo por las catecolaminas meduloadrenales. Su objetivo es movilizar los recursos corporales para la respuesta inmediata del organismo ante la posibilidad de una reacción de huida o de lucha (**Gray, 1971**). Al depender del sistema nervioso simpático y de las catecolaminas meduloadrenales, el

mantenimiento a largo plazo de esta primera respuesta supone un notable costo energético. Por lo tanto, la reacción es tan rápida como pasajera lo que la convierte en insuficiente cuando los estímulos desencadenantes persisten, sin embargo resulta suficiente cuando la actuación del agente estresante es temporal o cuando sólo se precisa una respuesta aguda de ajuste.

De esta forma, si la exposición al estímulo continúa, se inicia la segunda fase denominada **FASE DE ADAPTACION o DE RESISTENCIA**. En esta etapa, **Selye** describe una hipertrofia adrenal cuya causa reside en la activación de mecanismos endocrinos que permiten una regulación a largo plazo ejercida a través de la parte cortical de esta glándula (**Selye, 1937**). La integración del agente estresante por el sistema nervioso central provoca la activación del eje **hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA)** lo que conduce a un incremento de la secreción de glucocorticoides (GC) por la corteza adrenal (**Armario y cols., 1981, 1984a; Mormède y cols., 1984; Yeh, 1984; Alario y cols., 1987a; Gamallo y cols., 1988**).

Para una mejor comprensión de lo que continúa es conveniente recordar que el glucocorticoide mayoritario y activo secretado por las adrenales de casi todos los mamíferos es el cortisol, mientras que en los roedores es sustituido por la corticosterona.

La activación del eje HHA debe permitir la resistencia a la situación adversa, o bien desencadenar la puesta en marcha de mecanismos adaptativos específicos; por ejemplo, las respuestas termogénicas de la grasa parda frente al frío en roedores. Cuando esto no ocurre, la permanencia de las respuestas endocrinas mencionadas conducen al organismo a una tercera etapa o **FASE DE AGOTAMIENTO**, en la que los efectos nocivos sobre diferentes sistemas así como el agotamiento de las reservas energéticas y la inhibición de los mecanismos que permiten hacer frente a enfermedades e infecciones terminan por conducir a la muerte del animal (**Selye, 1971, 1978; Levi, 1973**).

La fase de agotamiento puede resultar inexplicable pero tiene un sentido biológico que trasciende al individuo. El objetivo de este proceso está dirigido a la supervivencia de la especie a costa de la supervivencia individual en situaciones extremas por su intensidad, duración o extensión.

Cada organismo de un mismo grupo es puesto a prueba, y la selección

natural permitirá la supervivencia de los más fuertes. Por otra parte, la reducción de la densidad de población (**Edward-Wynne, 1964**) como consecuencia de la disminución de las respuestas reproductoras individuales y del aumento de la mortalidad, proporciona una mejora de las condiciones limitantes (disponibilidad de alimento o refugio, desgaste social, etc.).

De esta forma se garantiza la supervivencia de un número reducido de individuos mejor dotados que perpetúen la especie. Finalmente, en condiciones altamente extremas, podría llegarse por estos mecanismos a la desaparición de la especie.

Hemos desarrollado hasta ahora la noción clásica sobre el concepto de estrés y el SGA. Sin embargo, actualmente, y sin contradecir lo expuesto, la evolución de ambos conceptos se centra fundamentalmente en la idea de que la respuesta fisiológica al estrés no resulta tan inespecífica y general como Selye propuso. Y así, por ejemplo, respecto a la hipertrofia adrenal, existen referencias a favor de que determinadas situaciones estresantes, tales como el choque eléctrico o el hacinamiento, provocan en ratas macho un mayor desarrollo de la glándula adrenal (**Gamallo y cols., 1986a,b; Restrepo y Armario, 1987; Alario, 1991**) pero también son numerosos los trabajos que no describen este aumento trófico tras la exposición continuada a otros agentes que provocan un similar aumento de la secreción de corticosterona que los citados (**Armario y cols., 1984b; Mormède y cols., 1984**). Por lo tanto, el hecho de que la estimulación adrenal provocada por el estrés desemboque o no en alteraciones tróficas permanentes del tejido adrenal, dependerá del grado de intensidad y duración del agente utilizado, pero también de otros factores que ahora se nos escapan, y que vendrían a incidir en el modelo específico de agente utilizado.

Conforme se obtienen nuevos resultados, aumenta la controversia en lo que se ha venido aceptando como norma general de respuesta endocrina al estrés. Esto conjuntamente con el hecho, cada vez más frecuente, de que distintos agentes estresantes pueden producir alteraciones cualitativamente diferentes de una misma variable, nos hace pensar que probablemente el estrés no produce una respuesta endocrina tan general como se pretende.

De hecho, se han encontrado posibles relaciones entre la naturaleza del agente estresante y las respuestas que éste desencadena (**Corson y Corson, 1983; Goldstein,**

1987). De este modo se ha observado diferente incremento en la secreción de adrenalina y noradrenalina dependiendo de la naturaleza del agente estresante (**Mason, 1975a; Dimsdale y Moss, 1980**). La acción de ambas catecolaminas no puede limitarse a una simple prolongación de los efectos del estímulo simpático, y las diferencias en sus propiedades han de tener algún significado fisiológico. Así, situaciones como el miedo, dolor, ansiedad y aquellas que implican actividad mental, aumentan principalmente los niveles de adrenalina, mientras que la conducta agresiva o las situaciones relacionadas con el ejercicio físico incrementan principalmente los niveles de noradrenalina. Nuestro grupo de trabajo (**Gamallo y cols., 1990**) encontró ligeras alteraciones de diferentes catecolaminas según el modelo de estrés crónico aplicado a ratas macho. Noradrenalina y dopamina aumentaban con la exposición al ruido y la dopamina lo hacía en respuesta al choque eléctrico, mientras que la adrenalina no estaba alterada en ningún caso.

Se cuestiona, por lo tanto, la inespecificidad de las reacciones producidas por diversos agentes nocivos, tal y como propuso Selye. En este sentido, **Mason (1975b)** explica que esta inespecificidad se debe al hecho de que tras diferentes agentes estresantes subyacen reacciones psicológicas semejantes. De esta forma, en ocasiones, la amenaza de recibir un estímulo nocivo puede suponer, en términos de respuesta hormonal, una situación estresante mayor que la exposición en sí (**Mason, 1968**). Este hecho es, sin embargo, conocido desde muy antiguo y tiene su fundamento en los mecanismos del reflejo condicionado descrito por **Ivan Paulov (1925)**, constituyendo el punto central de numerosas pruebas de aprendizaje reforzado en animales. Es de hecho un concepto ampliamente utilizado en los trabajos clásicos de conducta animal bajo el término de "conflicto emocional" (**Gray, 1971; Skinner, 1975; Alcock, 1978**).

Se pone en evidencia, de esta forma, que además de la naturaleza, intensidad y duración del agente estresante, existen toda una serie de factores que pueden influir sobre las reacciones fisiológicas del individuo, incluso con mayor intensidad que el propio estímulo (**Corson y Corson, 1983**). Se describe así la existencia de un componente psicológico del estrés, de entre cuyos factores se pueden destacar la actitud y el estado emocional del individuo, la predecibilidad y la capacidad de escapar a la acción del agente (**Laudenslager y cols., 1983; Vugle, 1985; Muir y Pfister, 1987**).

Experimentalmente, un ejemplo clásico es el de ratas sometidas a descargas eléctricas: se observa que aquellas con capacidad para poner fin al agente estresante (estrés eludible) o que recibían una señal de advertencia antes de ser expuestas a un shock eléctrico (estrés predecible) presentaban una respuesta de estrés menos señalada y menos patológica (niveles de corticosterona y de catecolaminas circulantes, úlceras gástricas, pérdida de peso, etc.) que las ratas que no tenían capacidad de control o que recibían la misma secuencia de choques sin previo aviso (Weiss, 1968; Lundberg y Frankenhauser, 1978). Aunque la sutileza de las variables psicológicas que en estos animales de experimentación pueden estudiarse sean de corto alcance, estos resultados también pueden hacerse extensivos a la psicología humana y de esta forma, los estudios en humanos han demostrado asimismo que una preparación psicológica y la capacidad de desahogarse son beneficiosos ante situaciones adversas (Sapolsky, 1990).

1.1. ACTIVACION DEL EJE HHA POR EL ESTRES

Como ya hemos comentado, el agente estresante detectado por el sistema sensorial o por los interoceptores del sistema nervioso va a ser integrado a nivel central. El resultado de esta integración desencadenará, en un primer momento, la respuesta nerviosa simpática y meduloadrenérgica, pero es a nivel hipotalámico donde tiene lugar el proceso final de la integración que se encarga de la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, mediador de la fase de **RESISTENCIA o ADAPTACION**, que en las situaciones de exposición a estrés crónico, como en el caso de este trabajo, es la que centra nuestro interés.

Vamos a comentar pues, con más detenimiento, los principales niveles de la activación del eje HHA por el estrés que conducen al aumento de glucocorticoides circulantes.

Los mecanismos neuroendocrinos derivados de la integración del agente estresante tienen lugar en el **núcleo paraventricular** del hipotálamo, cuyas neuronas reciben el nombre de **neuronas parvocelulares** y proyectan sus axones hacia la capa externa de la **Eminencia Media**. Estas neuronas sintetizan una neurohormona, la **CRH** u **hormona**

liberadora de corticotropina (revisiones en **Antoni, 1986; Rivier y Plotski, 1986**), que es almacenada en el terminal axónico y liberada por él a los vasos del sistema portal hipotálamico-hipofisario a nivel de la propia Eminencia Media. La acción como neurohormona de la CRH se ha comprobado porque la sección de los vasos del sistema portal hipotálamico-hipofisario conduce a una hipofunción de la hipófisis anterior (**Carpenter, 1985**).

El núcleo paraventricular es un núcleo de integración que recibe aferencias procedentes de distintos núcleos encefálicos entre los cuales se hallan núcleos de relevo de las vías sensoriales, aferencias viscerales, del sistema límbico (que integra información afectiva y emocional), del órgano subfornical, del núcleo preóptico así como de importantes zonas hipotálamicas vecinas. Estas aferencias modifican la actividad nerviosa de las neuronas productoras de CRH a través de diferentes neurotransmisores como acetilcolina, serotonina, catecolaminas y GABA (**Barbanel y cols., 1987**). Los tres primeros frente al último ejercen una acción estimuladora de la secreción de CRH. Este control nervioso representa el mecanismo de integración del estímulo estresante con la posterior respuesta nerviosa u hormonal.

La CRH es un péptido de 41 aminoácidos cuya actividad fundamental va a ser, por vía humoral, estimular mediante unión a receptores específicos la producción de ACTH por las células corticotropas de la adenohipófisis. A pesar de que se sospechó su existencia ya en 1955 (**Guillemin y Rossenberg, 1955; Saffran y cols., 1955; Saffran y Schally, 1955**), su aislamiento y secuenciación no se consiguió hasta 1981 (**Vale y cols., 1981**).

La secreción y síntesis de CRH por las neuronas parvocelulares está bajo doble control. Por un lado, las aferencias nerviosas a las que nos hemos referido, y que suponen el mecanismo de integración del estrés frente al resto de información sensorial y nerviosa. Por otra parte, los propios niveles circulantes de glucocorticoides actúan sobre las neuronas parvocelulares controlando la secreción de CRH a través de receptores específicos.

La CRH se ha catalogado como el principal responsable de la liberación de ACTH por la adenohipófisis durante el estrés (**Plotsky y Vale, 1984**). Sin embargo, muy poco tiempo después de haberse aislado se tuvo claro que no era la única hormona

hipotalámica que estimula la secreción de ACTH. Conjuntamente con la liberación de CRH en la Eminencia Media, la neuronas parvocelulares liberan vasopresina, angiotensina, colecistoquinina, neurotensina y encefalinas en pequeñas cantidades, compuestos a los que se les supone una posible acción neuromoduladora.

Vasopresina, angiotensina y colecistoquinina actúan sinérgicamente con la CRH potenciando su acción (Tilders y cols., 1985; Rittmaster y cols., 1987; Spinedi y cols., 1988) y parecen tener una importancia fisiológica en la regulación de la secreción de ACTH, caracterizándose así esta regulación por ser multifactorial.

El segundo nivel de activación del eje HHA ocurre en la adenohipófisis donde se produce la estimulación de la liberación al sistema portal hipofisario de la ACTH, u **hormona adrenocorticotropa**, péptido de 39 aminoácidos sintetizado a partir de una proteína de mayor tamaño: la proopiomelanocortina (Guillemin y cols., 1977). A nivel hipofisario y durante las situaciones de estrés tiene lugar, además, un efecto paralelo a la elevación de la producción de ACTH que consiste en el aumento de la liberación de péptidos opioides. Esta liberación se produce junto a la de ACTH, dado que ambos derivan del mismo precursor. Estos péptidos son las beta-endorfinas con un potente efecto analgésico (Howlett y Ress, 1986) y las alfa y gamma-endorfinas, cuyos efectos en situaciones de estrés no han sido aún determinados con claridad. Sin embargo, la activación de este sistema no está incluido directamente dentro del propio eje HHA, siendo por lo tanto un mecanismo colateral. Los objetivos de este trabajo son ajenos a estas acciones.

La ACTH alcanza rápidamente la corteza adrenal vía sanguínea y su acción dependerá de la unión a un receptor de membrana específico (Mizuno y cols., 1989; Sáez y cols., 1989) presente en las células que forman la zona fasciculada de la corteza adrenal.

Una evidencia importante a favor del efecto trófico de la ACTH sobre la corteza adrenal es que la hipofisectomía produce, entre otros efectos, una atrofia de las glándulas adrenales, reduciéndose considerablemente la zona fasciculada responsable de la secreción de los glucocorticoides (Jara-Albarrán, 1988; Fernández-Tresguerres, 1989).

La producción adenohipofisaria de ACTH es también controlada por una retroalimentación negativa ejercida por los niveles circulantes de glucocorticoides.

El último nivel de la activación del eje HHA consiste en estimular la producción de **glucocorticoides** por la corteza adrenal. El efecto de la ACTH sobre esta producción afecta fundamentalmente a la síntesis de estas hormonas, ya que la liberación es continua y no se produce almacenamiento de las mismas en la corteza de la glándula. La formación del complejo ACTH-receptor, en las células fasciculadas de la corteza, activa una cascada enzimática dependiente de AMPc, como segundo mensajero (**Baxter y Tyrrell, 1987**), teniendo lugar respuestas celulares a dos niveles: se favorece la disponibilidad de colesterol, principal precursor de estas hormonas, y se estimulan las propias rutas de síntesis a través bien de la activación de las enzimas claves, o aumentando la concentración de cofactores (fundamentalmente NADPH). El efecto de la ACTH sobre la disponibilidad de colesterol afecta tanto al colesterol circulante como al almacenado en las propias células corticoadrenales (**Brown y Goldstein, 1976; Rainey y cols., 1986**).

La importancia de los glucocorticoides frente a situaciones estresantes, se evidencia en animales adrenalectomizados, los cuales tienen muy disminuida la capacidad de tolerar agentes estresantes de forma crónica (**Keller y cols., 1983**). Esta incapacidad para resistir estímulos perjudiciales puede subsanarse mediante la administración exógena de glucocorticoides. Por la importancia de estas hormonas en nuestro trabajo, los glucocorticoides serán objeto de un capítulo especial.

La actividad de este sistema de regulación en cascada, conocido como eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, se autocontrola por un mecanismo de retroalimentación negativa cuando los niveles de glucocorticoides en sangre son elevados. Nos referimos, por supuesto, a los ya mencionados efectos inhibidores sobre la secreción hipotalámica de CRH y sobre la secreción hipofisaria de ACTH. El principal lugar de actuación es a nivel central, puesto que el hipotálamo es más sensible que la hipófisis a las variaciones plasmáticas de glucocorticoides. Se trata de una inhibición progresiva y proporcional a la dosis y duración del exceso de glucocorticoides (**Keller-Wood y Dallman, 1984; Won y cols., 1986; Keller-Wood, 1989**).

Esta acción inhibidora también es provocada cuando esos niveles

elevados se mantienen mediante la administración exógena de distintos análogos sintéticos, aunque en este caso la inhibición alcance, incluso, a reducir la producción endógena de estas hormonas en la adrenal. Este tema será abordado más a fondo cuando hablemos de los efectos de la dexametasona.

Pese a todo lo comentado, es difícil discernir con exactitud a qué nivel ocurre la autorregulación del eje HHA, ya que se imbrican no sólo las ya descritas acciones directas de los glucocorticoides sobre el hipotálamo y sobre la hipófisis, sino que, además, a nivel hipofisario, se produce una desensibilización a la CRH, acción mediada por una reducción de la población de receptores para esta hormona (**Hauger y cols., 1987**) y, en consecuencia, se inhibe la liberación de ACTH estimulada por CRH. Incluso se ha postulado la acción directa sobre las células adrenales dada la existencia en ellas de receptores para glucocorticoides (**Darbeida y Durand, 1987**). Asimismo podrían estar implicadas neuronas procedentes del hipocampo y sistema límbico, donde también se han detectado la existencia de receptores para glucocorticoides (**Sapolsky y cols., 1984; Sarrieau y cols., 1986; Van Eekelen y cols., 1988**).

Aunque sería de esperar que la acción inhibidora de los glucocorticoides sobre el eje HHA limitara su respuesta frente a una situación estresante prolongada, ésto no sucede.

La Figura 1 puede ayudarnos a comprender esta aparente paradoja. Observamos que después de la integración nerviosa del estímulo externo, se produce la activación del eje y el consecuente incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides lo que, a su vez, desencadena el mecanismo de autorregulación del eje. En efecto, esto es así, pero hemos de tener en cuenta, tal y como refleja la ausencia en la figura de la correspondiente flecha, que no hay ningún mecanismo de regulación mediado por el aumento de los niveles de glucocorticoides que incida sobre el estímulo suprimiéndolo, y es esa permanencia lo que hace posible una activación persistente del eje aun cuando el sistema de retroalimentación negativo es efectivo. Sólo cuando el "motor" de esa activación desaparezca el eje HHA recuperará su estado basal.

Otro aspecto interesante es el referido a si elevados niveles circulantes de glucocorticoides, previos a la exposición al estímulo estresante, pueden condicionar la capacidad del estímulo para desencadenar la respuesta del eje HHA. Parece ser que la contestación es afirmativa dependiendo de la naturaleza del estímulo estresante, de modo que algunos estímulos como la hipoglucemia insulínica, la hipoxia o la anestesia con éter son extremadamente "sensibles" a la acción inhibidora de los glucocorticoides, mientras que la hemorragia o la laparotomía son relativamente "insensibles" a ese efecto. Todo lo expuesto señala la necesidad de una exhaustiva caracterización de un modelo de estrés desde el punto de vista de su dinámica de respuesta hipotálamo-hipófiso-adrenal. En nuestro caso la caracterización del modelo de estrés por ruido que utilizamos ha sido realizada a diversos niveles (Alario y cols., 1987a,b; Gamallo y cols., 1988; Gamallo y cols., 1992).

La secreción de todas las hormonas del eje no es constante sino que presenta un ritmo circadiano relacionado con los períodos de sueño-vigilia. En la rata y otros roedores, animales de hábitos nocturnos, es a primeras horas del periodo oscuro cuando se produce la mayor secreción coincidiendo con la mayor actividad de estas especies. (Kaneko, 1980; Oxenkrug, 1984a). En el caso específico de la secreción de glucocorticoides, el mecanismo sincronizador del reloj interno de este ritmo no es dependiente exclusivamente de los ritmos circadianos de CRH y ACTH, sino que tiene un componente neurógeno mediado por la médula espinal a nivel T-7.

Sin embargo, durante el estrés se produce una rápida activación de todo el eje, independientemente de los valores plasmáticos previos de glucocorticoides y del momento del día en que se produzca.

Como puede entenderse de lo que acabamos de describir, la consecuencia final de la activación del eje HHA por el estrés consiste en aumentar los niveles circulantes de glucocorticoides. En la exposición crónica a un agente estresante, esta activación del eje HHA, no sólo dará una respuesta puntual o aguda, sino que se tenderá a un mantenimiento crónico de estos niveles elevados.

1.2. CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LOS GLUCOCORTICOIDES

Como se ha comentado, la actividad secretora de las **GLANDULAS ADRENALES** va a ejercer una acción mediadora de las respuestas fisiológicas al estrés. De la primera de estas respuestas o "reacción de alarma" se encargará la médula alertada por el SNS, y las respuestas al estrés crónico dependerán de la activación corticoadrenal. Dado que éstas últimas son las que centran nuestro estudio, comentaremos brevemente algunos aspectos de la anatomía funcional de la corteza adrenal.

La corteza de la glándula adrenal está constituida por tejido esteroidogénico, de origen mesodérmico. De las tres zonas en que, de acuerdo con **Arnold (1866)**, se subdivide clásicamente la corteza adrenal, la responsabilidad de la producción de glucocorticoides recae en la denominada zona fasciculada, y sucede así en virtud de la presencia en sus células de las enzimas implicadas en la biosíntesis de estas hormonas (Figura 2). Existe, pues, una especificidad de localización enzimática, de modo que la presencia en dicha zona de esas enzimas excluye aquéllas que catalizan la síntesis de otros productos de secreción corticoadrenal (esteroides sexuales y aldosterona).

Esta misma figura nos permite explicar porqué, en el caso de roedores, el glucocorticoide activo es la corticosterona y no el cortisol. El motivo reside en la ausencia de la enzima 17- α -hidroxilasa, por lo que la ruta de síntesis hacia el cortisol queda en estos mamíferos bloqueada. Por el contrario, la progesterona se decanta hacia la producción de corticosterona pues las enzimas 21-hidroxilasa y 11- β -hidroxilasa sí están presentes. Por otra parte, al estar la zona fasciculada de la adrenal de todos los mamíferos enzimáticamente especializada en producir glucocorticoides, se excluye la posibilidad de que la reacción continúe hacia la producción de aldosterona, de cuya síntesis se encarga otra zona de la corteza denominada glomerulosa.

La estructura de las hormonas esteroideas es un núcleo básico derivado del ciclopentano-perhidrofenantreno. La variabilidad de estas hormonas la confieren los diferentes sustituyentes que se incorporan a este núcleo, los cuales determinan además su grado de funcionalidad (**Idler, 1971**).

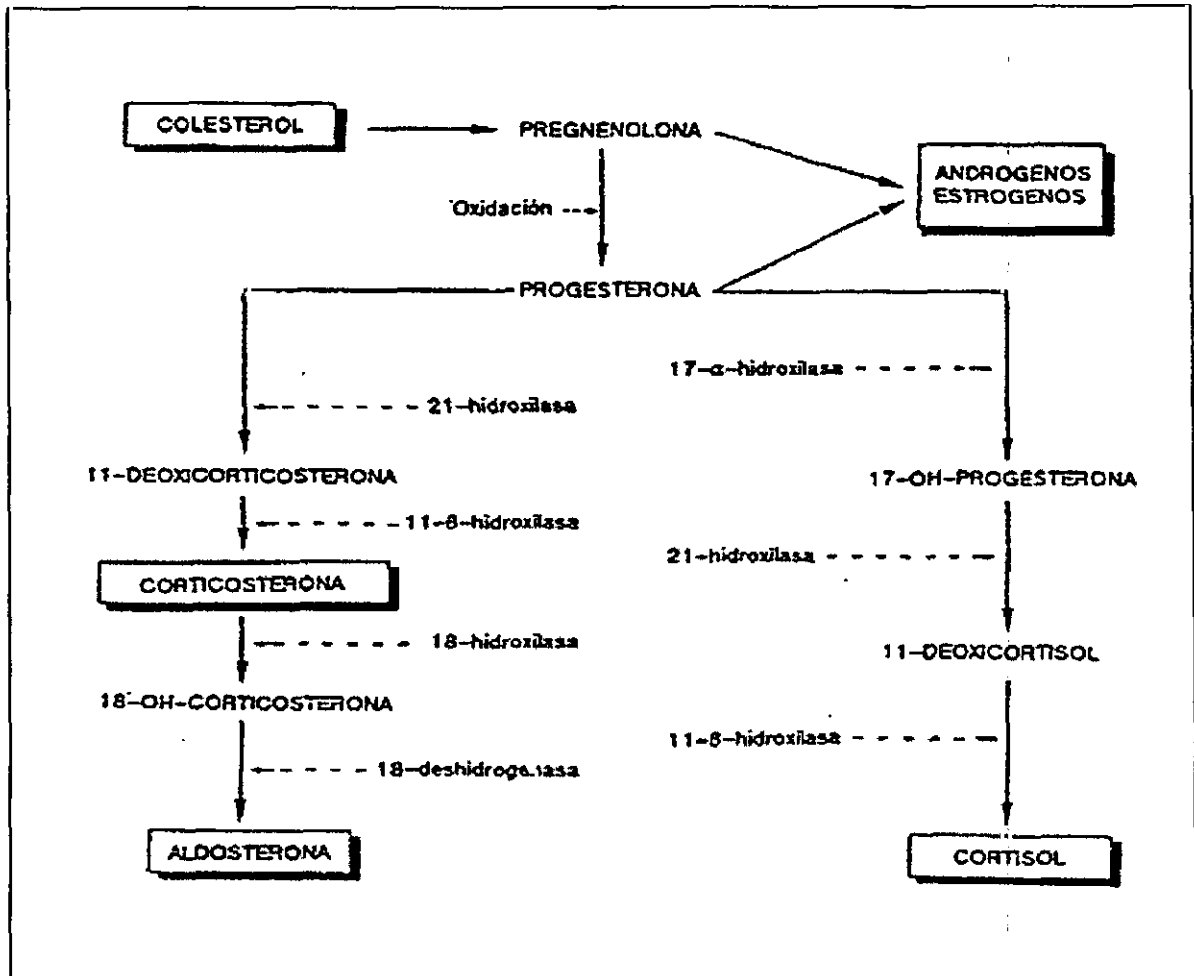


Figura 2: Ruta de síntesis de los corticosteroides adrenales.

Si acudimos nuevamente a la Figura 2 observamos que el precursor común de la síntesis de corticosteroides es el colesterol. Una vez en el interior celular se transforma en pregnenolona, siendo esta conversión la etapa limitante de la biosíntesis de las hormonas esteroideas. A continuación, diversas hidroxilaciones en diferentes rutas de síntesis darán lugar, como hemos dicho, a los correspondientes tipos de esteroides según la diferente

zona de la corteza adrenal.

Estas rutas de síntesis son las principales, pero además existen rutas secundarias o alternativas en las que se altera el orden de actuación de las enzimas mencionadas.

Los glucocorticoides sintetizados se liberan directamente a la sangre, en la que circulan bien de forma libre, bien formando compuestos con proteínas séricas específicas.

Estas proteínas son fundamentalmente la transcortina o CBG ("corticosteroid binding protein") y la albúmina. Tanto el cortisol como la corticosterona circulan en plasma principalmente unidos a la transcortina (en un 70-80%) (**Klosterman y cols., 1986; Whitworth, 1987**). La albúmina tiene menos afinidad por los esteroides que la CBG, sin embargo, transporta aproximadamente un 20% del cortisol circulante (**Klosterman y cols., 1986**). Su papel cobra interés cuando los niveles de esteroides son muy elevados, ya que su abundancia en plasma hace que pueda transportar el exceso de hormona cuando la transcortina está saturada.

Sin embargo, la hormona biológicamente activa es la forma libre, ya que unida a la proteína no puede atravesar con facilidad las membranas celulares.

Para que las hormonas corticoadrenales ejerzan su acción es necesario que interaccionen con receptores específicos de las células diana. Para que esto suceda deben atravesar la membrana plasmática ya que estos receptores son intracelulares, sin embargo la naturaleza lipofílica de los esteroides facilita su paso libre.

Frente a la hipótesis formulada en 1968, de forma independiente, por **Jensen y cols.** y **Gorski** o "hipótesis de los dos pasos", y por la que el receptor sería una proteína citoplásmica, otros investigadores (**Gasc y Baulieu, 1986; Rossini, 1987**) propusieron un nuevo modelo de acción, mayoritariamente aceptado en la actualidad, en el cual el receptor de esteroides se localizaría en el núcleo celular.

Los procesos de unión con el receptor y su posterior efecto sobre el ADN han sido propuestos por varios autores (**DeNicola, 1985; Tienrungroj y cols., 1987; Dalman y cols., 1988**). Resumidamente, la acción de los glucocorticoides modifica la expresión génica, alterándose la producción de ARNm específicos (**Schüle y cols., 1988**). También se ha postulado mecanismos posttranscripcionales, en cuyo caso la acción del esteroide se ejercería a nivel de la degradación de ARNm ya transcrito, lo que en definitiva conduciría también a alterar la síntesis proteica.

Las hormonas esteroides son degradadas rápidamente en el organismo y excretadas por la orina como conjugados del ácido glucurónico. Este catabolismo se efectúa, principalmente, en el hígado; si bien el riñón y otros tejidos poseen asimismo esta capacidad.

1.2.1. EFECTOS FISIOLÓGICOS

Al considerar el SGA descrito por Selye, ya se apuntaba que la finalidad de la activación del eje HHA, consistía en permitir la "resistencia o adaptación" a la situación representada por el agente estresante. En relación a esto, el papel que desempeña el aumento de la producción de glucocorticoides por la adrenal es consecuencia, fundamentalmente, de las acciones de estas hormonas sobre el metabolismo intermediario.

En estas condiciones, los glucocorticoides, como comentaremos a continuación, potencian y extienden la duración de la hiperglucemia producida por el glucagón, la adrenalina y la hormona de crecimiento (GH), mientras que acentúa la movilización proteica, evitando la caída de los niveles plasmáticos de glucosa, y permitiendo el suministro de este metabolito al sistema nervioso y a la musculatura hasta que el organismo se adapte a la situación estresante.

Efectivamente, la acción más específica de los glucocorticoides, en el animal adulto, va a ejercerse sobre el metabolismo hidrocarbonado. Experimentalmente, los efectos sobre el metabolismo intermediario se manifiestan de forma evidente en animales adrenalectomizados (**Foss y cols., 1987**) y en pacientes con déficit de glucocorticoides

(enfermedad de Addison); en ambos casos y ante cortas situaciones de ayuno se produce una marcada hipoglucemia, así como el agotamiento casi inmediato de las reservas de glucógeno. La administración de glucocorticoides reestablece ambas deficiencias (**Jara-Albarrán, 1988**).

Los glucocorticoides son pues hormonas hiperglucemiantes y, por lo tanto, diabetogénicas. Sus acciones anabólicas se ejercen fundamentalmente a nivel hepático, estimulando los procesos de gluconeogénesis y glucogenogénesis, favoreciendo la captación de aminoácidos y de ácidos grasos, así como la síntesis proteica (activación enzimática). La inducción de la ruta gluconeogénica es el resultado de su acción incrementando la actividad de la piruvato carboxilasa y la síntesis de fosfoenol piruvato carboxilasa, fructosa 1,6 difosfatasa y glucosa 6 fosfatasa (**Garland, 1986, 1988**). Los elevados niveles de glucosa hepática promueven la glucogenogénesis, pero además esta ruta se favorece por la conversión de la glucógeno sintetasa b inactiva en su forma activa, a través de una reacción que simultáneamente inhibe la glucogenolisis.

Sin embargo, a nivel periférico van a tener una acción totalmente contraria, promoviendo el catabolismo proteico o lipídico, e induciendo regresión celular. Los aminoácidos libres y ácidos grasos liberados en esta acción catabólica van a servir posteriormente como sustrato para la gluconeogénesis hepática, dando como resultado un aumento de la glucosa en sangre o del glucógeno hepático.

La principal fuente de proteínas para la movilización de aminoácidos son el plasma y la musculatura. Esta acción, en situaciones de exceso de glucocorticoides, conduce a una notable reducción de la masa muscular que también obedece a un efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre la síntesis de proteínas del músculo al disminuir su capacidad ribosomal (**Kelly y cols., 1986**). Estos aminoácidos son desaminados en los propios tejidos periféricos, formándose principalmente alanina y glutamina que son utilizados como sustrato principal para la formación de glucosa por el hígado y el riñón, respectivamente. Los aminoácidos liberados van también a influir como catalizadores sobre la actividad de las enzimas glucolíticas y gluconeogénicas.

A diferencia del músculo esquelético, el músculo cardíaco no muestra regresión frente al exceso de glucocorticoides. El trabajo anteriormente mencionado (**Kelly y**

cols., 1986) incluye también en su estudio al músculo cardíaco, detectando un incremento de su contenido de ARN y proteínas inducido por los glucocorticoides administrados. Por otra parte, la ausencia de estos puede conducir a un empeoramiento de la función miocárdica. Todos estos resultados nos conducen a pensar en una implicación de los glucocorticoides como potenciales reguladores del turnover de las proteínas cardíacas (**Gagnon y cols.**, 1987).

En los tejidos periféricos los glucocorticoides inhiben, además, la captación de glucosa por las células, por lo que contribuyen a aumentar la glucemia. No obstante, el corazón y el encéfalo no son afectados por esta acción y la glucosa en exceso puede ser utilizada por estos órganos vitales.

Evidentemente, la fuente de ácidos grasos y glicerol será el tejido adiposo. Los glucocorticoides no sólo ejercen una acción lipolítica sino que, además, favorecen las acciones de la adrenalina y la hormona de crecimiento. El resultado de la lipólisis se conducirá hacia el hígado como sustratos para la gluconeogénesis. Por otro parte, al inhibir la entrada de glucosa y de ácidos grasos en estas células, dificultan la lipogénesis. El único tejido graso que se ve excluido de esta acción es la grasa parda en los roedores. Nuestro propio grupo de trabajo, en colaboración con otros investigadores especializados en grasa parda, tiene evidencias de que la administración de glucocorticoides puede provocar un aumento del contenido lipídico de este tejido (**Gamallo y cols.**, 1987). Evidentemente esto es consecuencia de la especial función termogénica realizada por la grasa parda.

A nivel de tejidos periféricos son relevantes, para este trabajo, las acciones de los glucocorticoides sobre el esqueleto, sobretodo su acción sobre el metabolismo del calcio, las cuales serán tratadas con profundidad en el apartado correspondiente.

Otras acciones específicas de los glucocorticoides van a realizarse durante las fases embrionarias, regulando los procesos de diferenciación celular y el desarrollo de distintos órganos, siendo esta acción reguladora diferente según la fase temporal en la que se encuentre la maduración del organismo. Son responsables, así, de la síntesis y liberación del surfactante pulmonar fetal y de los procesos de maduración pulmonar (**Navarro y cols.**, 1989). En el riñón, durante la embriogénesis de aves, se ha observado que ejercen un efecto tónico supresivo sobre la proliferación celular a través de la inducción de sus propios

receptores (**Bellabarba y cols., 1983**). Esta acción inhibidora tónica sobre ciertos procesos relacionados con el crecimiento también la ejercen durante el desarrollo y la maduración posnatal del cerebro como ha sido constatado en ratas por **Meyer (1987)**. Por otra parte, aparecen implicados en la diferenciación embrionaria del tejido cromafin (**Ehrlich y cols., 1989**) y poseen un importante papel sobre la formación de las microvellosidades intestinales, así como otros muchos efectos que pueden ser consultados en **Herrera (1988)**.

Sobre el sistema cardiovascular, una de las acciones conocida de los glucocorticoides es la que ejercen sobre el mantenimiento de los niveles de presión arterial, de forma que la exposición a situaciones estresantes así como la administración de glucocorticoides o ACTH genera hipertensión (**Alario y cols., 1987a; Gamallo y cols., 1988**). Esta alteración es frecuente también en pacientes con Síndrome de Cushing, provocado por una hipersecreción de glucocorticoides (**Whitworth, 1987**), mientras que en situaciones en los que los niveles de estas hormonas se reducen (enfermedad de Addison), se produce hipotensión (**Jara-Albarrán, 1988**). Se apunta hacia una acción de los glucocorticoides potenciando el efecto presor de las catecolaminas y la angiotensina (**Armario y cols., 1981, Armario y Castellanos, 1984; Dobrakovova y cols., 1984; Yeh, 1984**) y, por lo tanto, puede hablarse de un efecto indirecto vasoconstrictor. No se descarta tampoco que pudiera estar involucrada su capacidad de inhibir la síntesis de sustancias vasodilatadoras tales como la histamina, prostaglandinas, bradicinina y factores epiteliales.

Otros efectos sobre el sistema circulatorio son ejercidos a nivel de la propia sangre. Además de los problemas de coagulación, consecuencia de la alteración en los niveles de sustancias como los tromboxanos, otros efectos se producen sobre las células sanguíneas. Los glucocorticoides ejercen una acción reguladora de la densidad de población de los eritrocitos favoreciendo por un lado la eritropoyesis y por otro los mecanismos fagocíticos que retiran de la circulación los eritrocitos envejecidos.

Los glucocorticoides ejercen también esa acción reguladora sobre otras poblaciones celulares, aumentando el número de leucocitos polimorfonucleares y disminuyendo el de linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos circulantes. Posiblemente este efecto guarde también relación con procesos de redistribución. Dado que estas células sanguíneas participan en la respuesta inmunitaria, y que la interacción entre el estrés y el

sistema inmune será objeto de un apartado diferente, comentaremos entonces otros efectos de los glucocorticoides sobre estas células.

A nivel gástrico, los glucocorticoides promueven la secreción de ácido clorhídrico, aumentan el flujo de sangre en la mucosa pero disminuyen la proliferación del epitelio gástrico. Cuando la dosis administrada es sobre fisiológica aumenta la incidencia de úlcera péptica (**Wallace, 1987**). La estimulación neurógena incluida en las respuestas al estrés reduce además la motilidad gástrica e intestinal (**Williams y cols., 1987**).

Más datos acerca de los efectos fisiológicos de los glucocorticoides se pueden encontrar en **Jara-Albarrán (1988)**, **Bartolomé (1989)** y **López-Calderón (1992)**.

1.2.2. ACCIONES FARMACOLOGICAS: DEXAMETASONA

La utilización de los glucocorticoides, en la práctica médica, se halla muy generalizada debido a su amplio espectro de actuación en el organismo. El tratamiento de numerosas afecciones (linfomas, anemias, edemas cerebrales, procesos inflamatorios, asma, etc.) contempla el uso de glucocorticoides (**Bartolomé, 1989**).

La terapia con glucocorticoides puede conducir a la presentación de reacciones adversas, principalmente cuando se emplean durante periodos de tiempo prolongados. Así, se producen alteraciones en los mecanismos de regulación endocrina lo que conduce, a su vez, a cambios en un gran número de funciones metabólicas y a una serie de acciones no deseadas, entre las que destaca: hipertensión arterial, osteoporosis, trastornos de la función sexual, insuficiencia suprarrenal, miopatías, etc. Consecuencia todas ellas de la exacerbación de sus propios efectos.

Actualmente existe un gran número de compuestos sintéticos comercializados, con diferente grado de actividad y de vida media, pero sin diferencias cualitativas de consideración. Entre los más utilizados (prednisolona, prednisona, cortisona, hidrocortisona) se encuentran los derivados fluorados como la betametasona y la dexametasona.

La dexametasona (9 alfa-flúor, 16 alfa-metil prednisolona) puede administrarse por vía oral, intravenosa o subcutánea (**Handa y cols., 1984**); en todos los casos, y aunque varían los tiempos de absorción, se alcanzan niveles porcentuales elevados de concentración en plasma siendo, por lo tanto, un glucocorticoide de vida media larga (**Bartolomé, 1989**). Difunde bien en los tejidos, distribuyéndose principalmente en hígado, riñones, pulmón, suprarrenales, páncreas, médula ósea e hipófisis. También atraviesa la barrera hematoencefálica, aunque en el líquido cefalorraquídeo aparece en muy baja proporción. Se elimina fundamentalmente en la orina sin sufrir ninguna transformación, aunque un pequeño porcentaje se conjuga con los ácidos glucurónico y sulfúrico.

En el campo experimental, la dexametasona se utiliza frecuentemente a causa de su potente efecto glucocorticoide. Es capaz de inhibir la secreción hipofisaria de ACTH (**Hashimoto y cols., 1981; Nokagaura y cols., 1985**), y en consecuencia la producción endógena de glucocorticoides (**Ramaley, 1975, 1976; Kalin y Shelton, 1984; Stangl y cols., 1986; Mazzocchi y cols., 1988a,b**). Este efecto lo consigue por su alta afinidad por los receptores de glucocorticoides hipotalámicos e hipofisarios, ejerciendo la acción de retroalimentación negativa anteriormente comentada. El nivel de actividad HHA puede determinarse mediante el denominado test de supresión de dexametasona, en el que se determina la producción endógena de cortisol o corticosterona frente a la administración de dexametasona (**Ceulemans y cols., 1984; Oxenkrug y cols., 1984b; Hermus y cols., 1986; Stangl y cols., 1986**). En estos casos la medida de los niveles plasmáticos de cortisol o corticosterona es indicativa de la potencia bloqueadora de la dexametasona en términos de ACTH, y por consiguiente es una forma indirecta de medir el mantenimiento crónico de la actividad glucocorticoide generada por la dexametasona u otro compuesto sintético administrado.

1.3. EFECTOS DE LA ACTIVACION DEL EJE HHA SOBRE LOS SISTEMAS NERVIOSO, ENDOCRINO E INMUNE

Ante las situaciones de exposición crónica al estrés, el organismo sufre no sólo el aumento de la secreción de catecolaminas y glucocorticoides adrenales, y sus

consecuencias fisiológicas, sino también el desajuste de sus sistemas informativos: nervioso, endocrino e inmune.

En el caso de los sistemas nervioso e inmune, las alteraciones son en realidad parte de las acciones ejercidas por los glucocorticoides, mediadas a través de la presencia de receptores para estas hormonas en neuronas a nivel central o en las células inmunitarias. Por otra parte, la actividad nerviosa global resulta también alterada por los propios mecanismos integradores del estrés que se producen, con anterioridad a la llegada de información al hipotálamo, en diversos centros nerviosos de acuerdo con la naturaleza del estímulo y que, además de alertar al sistema neuroendocrino, elaboran sus propias respuestas independientes. Ello conduce a variadas alteraciones de índole neurovegetativo o afectivo-emocional.

Pero, dado que nuestros objetivos no se plantean en relación a respuestas nerviosas o inmunitarias, sólo haremos una breve reseña de los efectos más relevantes producidos por el estrés al final de este apartado para centrarnos ahora en los desajustes que afectan al sistema endocrino. En este caso se puede garantizar que estas alteraciones son provocadas por la ruptura del equilibrio funcional global al activarse permanentemente el eje HHA. Por ello, muchas de las consecuencias fueron ya descritas por Selye como síntomas del SGA.

Efectivamente, el patrón de regulación neuroendocrina hipotálamo-adenohipófisis desarrolla un conjunto de ejes paralelos que acaban, cada uno, en diferentes glándulas periféricas (adrenales, tiroides, gónadas), así como controlan la producción de una serie de hormonas adenohipofisarias de acción propia y directa sobre los tejidos: hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL). Una visión general de la variada producción hipotálamo-adenohipofisaria nos la proporciona la Figura 3.

El equilibrio de este sistema funcional conjunto es muy fino y la alteración de un eje secretor concreto lo rompe desajustando necesariamente los restantes. Así cuando se activa el eje HHA, la actividad de la adenohipófisis se dirige principalmente a la producción de ACTH, alterándose la síntesis de las demás hormonas tróficas y provocando una reducción funcional de los ejes tiroideo (HHT) y gonadal (HHG).

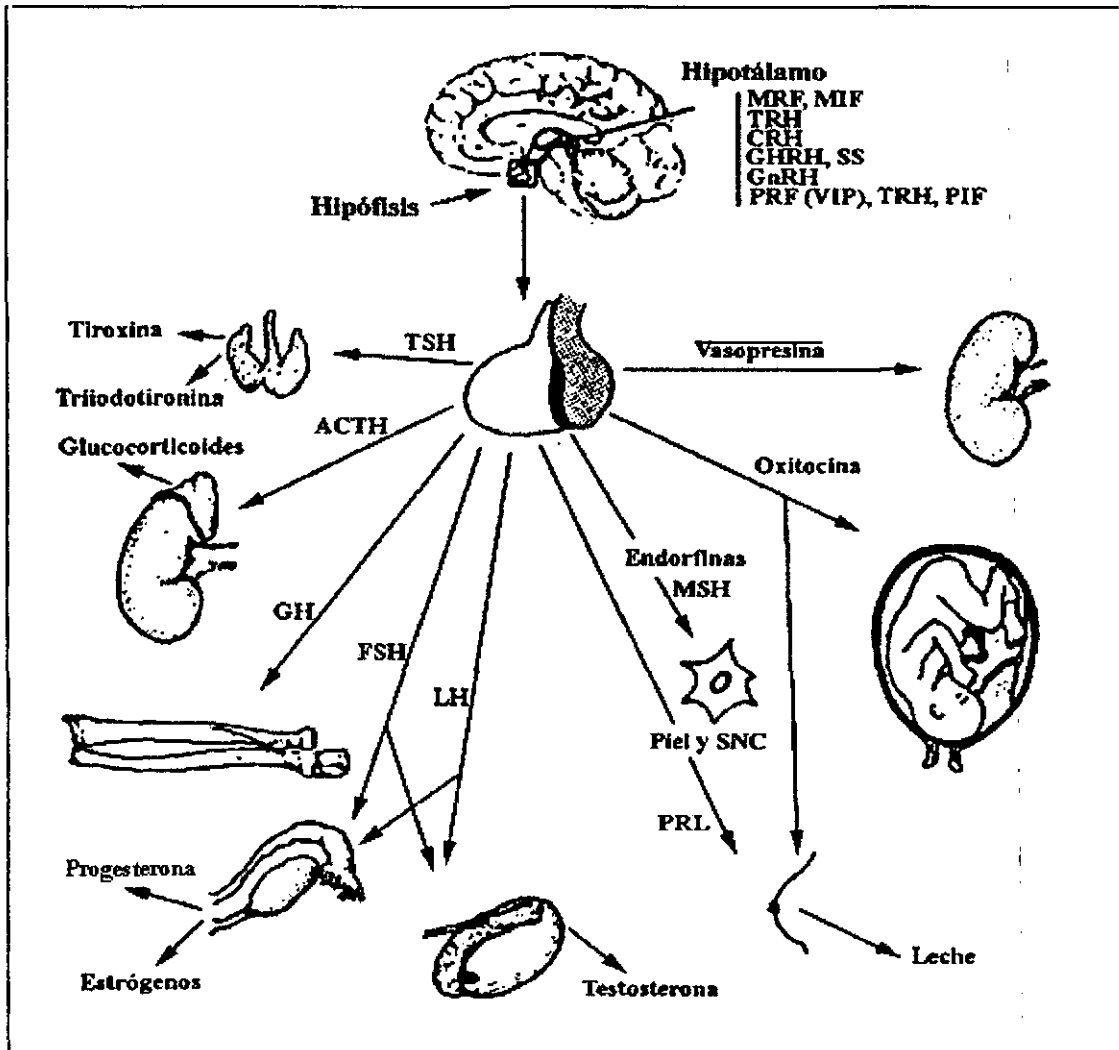


Figura 3: Secreción hipotálamo-hipofisaria.

Además, varios autores han observado que la activación permanente del eje HHA provoca un desajuste en los mecanismos de modulación de la secreción en la adenohipófisis, de forma que ésta no responde ni a los ritmos circadianos ni a la

retroalimentación negativa por glucocorticoides (**Przekop y cols., 1985; Fernández-Tresguerres, 1989**).

En relación al eje tiroideo, la idea clásica incorporada en la descripción del SGA describe una reducción de la producción hipofisaria de la hormona estimulante del tiroides (TSH), que conduciría a una reducción de la función tiroidea y su consecuente efecto en el metabolismo intermediario. Sin embargo, los efectos del estrés sobre la TSH son contradictorios y así mientras algunos investigadores señalan una reducción de la actividad tiroidea por un posible efecto de los glucocorticoides sobre el hipotálamo y/o hipófisis (**Izumi y Fukuyama, 1984**), otros por el contrario encuentran un aumento de dicha actividad que resultaría en un incremento del metabolismo en situaciones estresantes (**Armario y cols., 1986**).

Por el contrario, las alteraciones sobre la síntesis de hormonas gonadotrópicas están más claramente aceptadas, de forma que el estrés prolongado provoca una hipofunción del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, lo que conduce a una disminución de los niveles plasmáticos de estrógenos, andrógenos y progesterona. En consecuencia se produce la supresión de muchas funciones orgánicas relacionadas con la actividad sexual y reproductiva (**Armario y Castellanos, 1984; Jurcovicova y cols., 1984; López-Calderón y cols., 1987; Ariznavarreta y cols., 1989**).

Recordemos que una de las manifestaciones de la respuesta al estrés recogida en el SGA era precisamente la disminución de la función reproductiva. Esta alteración es el resultado de lo anteriormente comentado en relación al eje HHG, pero también (**López-Calderón y cols., 1984; Jurcovicova y cols., 1988**) de las modificaciones de una de esas hormonas adenohipofisarias no ligadas directamente a un eje: la prolactina. **López-Calderón y cols. (1989)** describen una reducción de la liberación de PRL por la exposición prolongada al agente estresante, siendo en tal situación dicho efecto inhibitorio mediado por los glucocorticoides (**López-Calderón y cols., 1984**).

En efecto, la PRL tiene un papel fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria y es imprescindible en el inicio y mantenimiento de la lactancia, de ahí que la

alteración de sus niveles circulantes modifique la función reproductora, pero además de estas acciones propias, existe una fuerte interacción entre el eje HHG y la PRL dado que ésta modula la secreción de gonadotropinas, controlando por ello de manera indirecta la función gonadal en ambos sexos. También se han puesto de manifiesto efectos sobre la síntesis de las demás hormonas hipofisarias, regulando así todos los procesos que éstas controlan.

Otra de esas hormonas adenohipofisarias de acción propia cuya síntesis y liberación resulta afectada por la activación permanente del eje HHA es la hormona de crecimiento (**Kant y cols., 1983; Armario y cols., 1986**). Existen nuevamente contradicciones en cuanto al signo de tales alteraciones de modo que, para ciertos autores, la administración prolongada de ACTH o de glucocorticoides disminuye la secreción de GH (**Izumi y cols., 1985; Nakagawa y cols., 1987a,b**), mediado al parecer por un incremento del tono de somatostatina (**Giustina y cols., 1989,1990; Wehrenberg y cols., 1990a,b**). Otros, sin embargo, describen un incremento en la producción de esta hormona en determinadas situaciones de estrés (**Brown y Heniger, 1976**) o frente a la administración aguda de bajas dosis de ACTH (**Valenti y cols., 1986**) o glucocorticoides (**Thakore y Dinan, 1993**), cuya función se relacionaría con la movilización de reservas metabólicas.

Estas acciones sobre la GH van a causar alteraciones en el crecimiento pero, además, hay que tener en cuenta que la hipersecreción de glucocorticoides, como consecuencia de la activación crónica del eje HHA, va a ejercer, como vimos anteriormente, un efecto lipolítico a nivel del tejido adiposo que se manifestará en alteraciones en el peso corporal. Por otra parte, este efecto lipolítico conduce a una distribución característica de la grasa corporal, como se evidencia en los individuos afectados por el Síndrome de Cushing, los cuales presentan un acúmulo de grasa en la zona posterior del cuello, en el área supraclavicular y en la cara, con una disminución de grasa en las extremidades. Se cree que estos cambios de distribución son debidos a una especial sensibilidad de ciertos tejidos grasos a las acciones lipogénicas y antilipolíticas de la insulina, la cual se encuentra aumentada por la acción diabetogénica de los glucocorticoides (**Bartolomé, 1989**). Ambos efectos, reducción del crecimiento mediado por GH y pérdida y redistribución de la grasa corporal, pueden converger como causa de alteraciones en el peso corporal. No se descartan, además, efectos propios de los glucocorticoides sobre el crecimiento y desarrollo celular.

Hasta aquí hemos mencionado los efectos que la activación crónica del eje HHA tiene sobre el sistema endocrino. Respecto a la incidencia sobre el sistema nervioso central, los glucocorticoides modifican la excitabilidad neuronal a través, como comentamos al inicio de este apartado, de receptores específicos muy abundantes en diferentes áreas cerebrales (**Dubrovsky y cols., 1982; Avanzino y cols., 1987**). Asociados a elevados niveles de glucocorticoides o a situaciones de estrés se han descrito efectos como la euforia, insomnio, inquietud y anorexia. Enfermos con síndrome de hipocortisolismo manifiestan también alteraciones de carácter afectivo-emocional pero de signo contrario, como apatía y depresión (**de Castro, 1989; Velasco y cols., 1993**).

Respecto al sistema inmune, las primeras observaciones realizadas por Selye, ya destacaban una reducción de la resistencia a las infecciones, acompañada de la atrofia de órganos inmunocompetentes tales como el timo. En efecto, los glucocorticoides ejercen importantes acciones sobre la inmunidad específica (**Munck y cols., 1985; Sapolsky y Donelly, 1985**), causando entre otros efectos una linfopenia a resultas de la cual órganos como el timo, bazo y ganglios linfáticos involucionan, corroborando las observaciones efectuadas por Selye a este respecto (**Rehulka, 1988**). Otra acción característica de los glucocorticoides, con una clara aplicación terapéutica, es la prevención de las reacciones inflamatorias en respuesta a sustancias extrañas o lesiones tisulares. Esta acción es ejercida a través de la alteración de procesos implicados en la formación de edemas, así como a través de la liberación de histamina e inhibición de la síntesis de toda una serie de sustancias mediadoras de la respuesta inflamatoria y de la coagulación sanguínea (**Tranchant y cols., 1989**).

Los datos de los que se disponen actualmente ponen de manifiesto que, a veces, los efectos de los glucocorticoides sobre el sistema inmune son contradictorios. La interpretación actual más razonable de esos efectos controvertidos del estrés es que se producen cuando se afectan las respuestas inmunes específicas. Sin embargo, aunque en ciertos casos (**Bateman y cols., 1989; Boumpas y cols., 1991**) estimulen ciertas acciones el resultado conjunto es supresivo. Otras veces son las diferencias entre los distintos modelos de agente y el momento en que estos dejan de ser estrés los responsables de dicha controversia.

Todos los resultados descritos confirman los efectos que la activación del eje HHA tiene frenando las actividades encaminadas hacia la reproducción, el crecimiento y la resistencia a los procesos infecciosos (Selye, 1971, 1978; Levi, 1973). A pesar de que estas acciones tienen, a primera vista, un carácter claramente negativo para el individuo responden, sin embargo, al objetivo de conseguir una adaptación a la situación estresante. El organismo no hace más que potenciar aquellos mecanismos de defensa que facilitan una enérgica acción inmediata, supeditando a ellos aquellos procesos que no resultan tan eficientes para lograr esa meta. Es en suma, una cuestión de prioridades pero también la expresión de la admirable capacidad del organismo para reaccionar frente al medio y mantener constantemente su homeostasis, permitiendo con ello, ni más ni menos, que la supervivencia del individuo.

Evidentemente, la fase de resistencia o adaptación tiene un límite, de modo que si el estímulo desencadenante adquiere un carácter permanente es inmediato pensar en las consecuencias perjudiciales en que revierte, no sólo las derivadas de procesos infecciosos sino también de la disminución de la resistencia a otras enfermedades no mediadas por el sistema inmune. Nos referimos al efecto que el mantenimiento de elevados niveles de glucocorticoides tiene sobre diferentes tejidos y sistemas, que ya describimos en el apartado 1.2.2. relativo a los efectos fisiológicos de los glucocorticoides. Así, de forma resumida, la metabolización continua de la glucosa, sin respiro para almacenarla, conduce a la atrofia y fatiga de los tejidos. En un plazo de tiempo suficiente, los cambios cardiovasculares inducen la aparición de hipertensión lo que, a su vez, puede ocasionar lesiones en el corazón, vasos sanguíneos y riñones. La reparación de los tejidos resulta también afectada y, tal y como sugerían los resultados de Selye, se incrementa la propensión a padecer úlceras pépticas.

No olvidemos que a todas estas alteraciones se suman las relacionadas con las actividades de crecimiento y reproducción, también características de la fase de agotamiento y que, a pesar de sus perjuicios, poseen un significado biológico importante que incide de nuevo en el mantenimiento de un equilibrio, esta vez en un contexto más amplio donde la finalidad es la supervivencia de la especie.

2. CRECIMIENTO Y DESARROLLO OSEO

El desarrollo del ser humano se caracteriza por ser un proceso continuo y multifactorial al involucrar la actuación, en ocasiones secuencial, pero fundamentalmente conjunta y coordinada, de una serie de variables genéticas, endocrinas y nutricionales, cuyo resultado va a ser la organización y mantenimiento funcional del organismo.

Pero, además, el término **desarrollo** engloba el concepto de **crecimiento**, entendiéndolo éste como la expresión del incremento de cada una de las partes del organismo y de cada uno de sus diferentes órganos. Este incremento es el resultado pues de multiplicaciones celulares que modifican su dimensión, volumen y peso.

El crecimiento somático se va a producir a expensas, fundamentalmente, del crecimiento óseo dado que una de las funciones del esqueleto es la de erigirse como soporte estructural sobre el que se modela la forma y el tamaño de un ser vivo. En consecuencia, resulta interesante conocer ciertas características del tejido que constituye cada una de las unidades del esqueleto.

2.1. COMPONENTES Y ESTRUCTURA DEL TEJIDO OSEO

El hueso es un tejido altamente vascularizado y en continua remodelación pues a pesar de su rigidez, no es en modo alguno un tejido permanente e inmutable. Está constituido por distintos tipos de células y por una matriz extracelular.

La matriz extracelular posee un componente orgánico y otro mineral. El componente orgánico está formada por fibras de colágeno de tipo I o tropocolágeno, además de por pequeñas cantidades de proteínas séricas como la albúmina y otras de origen no plasmático entre las que se encuentran la actina, los proteoglicanos y la osteocalcina. Por su parte, el componente mineral está constituido básicamente por calcio y fosfato (éste último esencialmente en forma de hidroxapatita), y en menor proporción por magnesio, sodio, manganeso y potasio. El cristal de hidroxapatita se caracteriza por su capacidad para adsorber

en su superficie no sólo proteínas sino también iones del plasma sanguíneo que estarán en intercambio, más o menos rápido, con otros iones circulantes, existiendo además una regulación muy estrecha del grado de mineralización de la matriz extracelular.

Vamos a continuación a describir resumidamente algunos aspectos del componente celular, integrado básica y específicamente por osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Los osteoblastos se presentan al microscopio en dos formas bien definidas: osteoblastos activos e inactivos.

Esta diferenciación obedece a un criterio funcional, de modo que los **osteoblastos activos** son los efectivos en la síntesis del componente orgánico de la matriz extracelular, tal y como histológicamente lo corrobora la presencia de un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, característico de las células que llevan a cabo una intensa síntesis proteica.

Una vez que se ha sintetizado una porción de componente orgánico adecuada para un área ósea determinada, es cuando el osteoblasto activo puede seguir dos caminos: o derivar hacia **osteoblasto inactivo** quedando como una célula de revestimiento y como tal ejerciendo un control del flujo de iones a su través, o ser englobado en la matriz extracelular, dando lugar a un **osteocito**, localizado en una oquedad o laguna en cuya pared se abre un sistema profuso de canales que lo comunican con los osteoblastos inactivos de la superficie ósea.

En el caso de que el osteoblasto activo pase a ser un osteocito, nuevamente su grado de actividad determinará su diferenciación en osteocito activo e inactivo. Mientras que la forma inactiva del osteocito es la expresión última de su ciclo vital, el término "activo" hace referencia, al igual que sucedía con los osteoblastos activos, a su intervención en la producción del componente orgánico de la matriz extracelular. Pero, además, se ha relacionado con su posible participación en la reabsorción ósea tal y como indica la presencia de vacuolas y abundantes mitocondrias en su citoplasma, de hecho se ha podido comprobar que estas formas activas pueden, tanto movilizar el componente mineral conservando la matriz

extracelular, como reabsorber el componente mineral simultaneamente con la matriz.

Como podemos observar, las células expresan unas características histológicas al servicio de una actividad metabólica específica, cuyo grado de activación determina el uso de los términos "activo" e "inactivo".

Otro constituyente celular son los **osteoclastos**, grandes células multinucleadas con un origen embrionario controvertido a diferencia de los osteoblastos y los osteocitos de claro origen mesenquimal. En cualquier caso y desde el punto de vista funcional, lo destacable es la presencia en su citoplasma de numerosas mitocondrias, vacuolas y lisosomas; hecho que parece apoyar, de entre todas las hipótesis, su origen a partir de células madre hematopoyéticas resultantes de la fusión de fagocitos mononucleares. Esta ultraestructura nos avanza ya que son las principales células encargadas de la reabsorción del hueso, a lo que contribuye su gran movilidad a lo largo de la superficie ósea. Sin embargo, persisten actualmente ciertos puntos oscuros acerca de la secuencia de las etapas de la reabsorción ósea producida por estas células.

En este punto es importante indicar que el concepto de osteoblasto como una célula sólo formadora de hueso y de osteoclasto como una célula independiente encargada de su reabsorción está en constante revisión, y actualmente también se le atribuye al osteoblasto un papel intermediario en la reabsorción del hueso.

Los tres tipos de células descritos son, como hemos comentado, los específicos del tejido óseo pero existe una estrecha relación funcional con células integrantes de otros tipos de tejidos como los condroblastos y los fibroblastos. Estas células colaboran con los osteoblastos y los osteocitos en la producción de la matriz extracelular del hueso pues sintetizan precursores matriciales orgánicos (proteínas y mucopolisacáridos). Esta cooperación entre células óseas y otras pertenecientes a tejidos diferentes no debe extrañar. El origen embrionario de estos tipos celulares es común, siendo las células madre de origen mesenquimal precursoras de osteoblastos y condroblastos, dependiendo la diferenciación en uno u otro tipo celular de la integridad de la matriz circundante. Por otra parte, los tejidos óseo, conjuntivo y el cartilago son funcionalmente complementarios y su interrelación debe ser estrecha como veremos posteriormente.

A la vista de algunos de los aspectos mencionados de cada componente del hueso: celular, orgánico y mineral, resulta obvio que su organización en un tejido requiere no sólo una relación anatómica de proximidad, sino también una vinculación funcional de los mismos. De esta forma, las células, aun cuando representan una parte muy pequeña del volumen óseo, son las responsables como hemos visto de la síntesis y secreción del componente orgánico de la matriz extracelular. A través de esta función de síntesis comparten con el componente mineral la importancia a la hora de proporcionar al hueso una estructura adecuada, con unas características no sólo de solidez y resistencia, sino también de elasticidad que le permita hacer frente a una sobrecarga sin quebrarse. Por otra parte, la estrecha relación del componente celular con la matriz extracelular no sólo es decisiva para la estructura del hueso sino también para que otras funciones del tejido óseo, como el de constituirse en depósito y fuente de minerales, sean efectivas. En este sentido, las células son claves en el importante mantenimiento de la calcemia al regular la deposición y reabsorción de hueso.

Desde el punto de vista estructural el hueso es un tejido conectivo mineralizado, y es posible diferenciar dos tipos de tejido óseo de acuerdo con el modelo de estructura interna que presente: **reticular** y **laminar**. A su vez pueden distinguirse dos variedades de tejido óseo laminar: **laminar compacto** y **laminar esponjoso**.

El tejido óseo **reticular** corresponde, en el hombre, al tejido óseo embrionario, de ahí que reciba también el nombre de inmaduro. En el adulto esta estructura en retícula desaparece y sólo persiste en la cápsula del laberinto y en la proximidad de las suturas del cráneo.

El tejido óseo **laminar** corresponde al tejido óseo más común e importante en el adulto (también se denomina maduro), cuya estructura muestra una clara estratificación en capas denominadas laminillas.

En el caso del tejido **laminar compacto**, las laminillas se ordenan alrededor de los canales vasculares. Un canal vascular junto con las laminillas que lo rodean constituye una osteona o sistema de Havers. Los canales vasculares de las osteonas se comunican entre sí a través de un sistema de canales oblicuos llamados de Volkmann. La

estructura y el ordenamiento de las osteonas depende de factores mecánicos como sobrecargas y tensiones a que está sometido el hueso, pudiendo ser remodeladas cuando se modifican estos factores con el objeto de adaptarse a las líneas de fuerza.

En el tejido **laminar esponjoso**, las laminillas tienen la misma estructura histológica que las del laminar compacto pero no se ordenan concéntricamente alrededor de canales vasculares; por el contrario, forman una malla tridimensional de trabéculas y espículas con cavidades intercaladas llenas de médula ósea y tejido adiposo.

La nutrición del hueso proviene del periostio o capa de tejido conjuntivo que reviste al hueso en su totalidad excepto en aquellas partes recubiertas por cartilago. Esta capa es rica en vasos sanguíneos y linfáticos, así como en terminaciones nerviosas. En su estrato interno u osteogénico se originan los osteoblastos, de ahí la importancia del periostio en la consolidación de fracturas. Se ha observado que la aplicación de un estímulo mecánico sobre el hueso desencadena una respuesta celular adaptativa del periostio que conduce a la formación y reabsorción de hueso. De esta forma, el periostio, a través de su componente fibroso, actúa como un elemento transmisor de las presiones y tensiones mecánicas hacia la capa osteogénica, iniciándose un proceso de remodelación ósea (Pollard y cols., 1984; Storey y Feik, 1985, Feik y cols., 1987).

2.2. DESARROLLO, PATRONES DE CRECIMIENTO Y METABOLISMO OSEO

Las investigaciones morfológicas sobre el desarrollo óseo durante la embriogénesis han puesto de manifiesto que el hueso puede formarse en dos secuencias diferentes: formación de hueso **endocondral** y formación de hueso **intramembranoso**. Esta nueva nomenclatura en la denominación del hueso obedece sólo a un criterio distintivo del modo en que se forma. Cualquiera que sea el tipo de osificación, la estructura del tejido óseo en formación es reticular, adquiriendo posteriormente una estructura laminar, bien compacta o esponjosa según el caso.

En la formación de hueso **endocondral**, se produce la sustitución de un modelo cartilaginoso por hueso. Como consecuencia de la condricificación de células

mesenquimales se forman condensaciones cartilaginosas que, a modo de reducido modelo a escala, son el esbozo del futuro esqueleto. Un prerequisite para la formación de hueso endocondral es la presencia de condroclastos, células conjuntivas diferenciadas capaces de horadar el cartilago, que posteriormente será reemplazado por el hueso producido por los osteoblastos. El crecimiento y la sustitución del cartilago, y el depósito de hueso durante el desarrollo están coordinados de una forma tan ingeniosa que el hueso adulto, a pesar de la diferencia de tamaño, posee casi la misma forma que el modelo cartilaginoso inicial.

En la formación de hueso **intramembranoso**, el tejido conjuntivo embrionario se transforma directamente en tejido óseo. Este tejido conjuntivo contiene abundantes células mesenquimales que se transforman primero en osteoblastos y luego en osteocitos. Simultáneamente se forman también osteoclastos y aparecen fibras colágenas que cursan en distintas direcciones adquiriendo, como hemos dicho, una estructura reticular.

Como vemos, tanto en uno como en otro modelo de formación de hueso, aparece al principio un molde de tejido blando que gradualmente se convierte en tejido óseo por el desarrollo de la osteogénesis, frecuentemente por una aposición central, hasta osificarse todo el elemento esquelético. La aparición de tales centros de osificación ocurre en un largo periodo de tiempo. La mayoría de los huesos se osifican a partir de varios centros distintos, uno de los cuales aparece cerca del centro del futuro hueso hacia el final de la vida embrionaria o al comienzo de la fetal. En el caso de los huesos de las extremidades, costillas o columna vertebral, con una formación de tipo endocondral, este centro se ocupa de la osificación progresiva de la porción media o diáfisis hacia los extremos, los cuales son aún cartilaginosos en el momento del nacimiento. Estas regiones terminales o epífisis son osificadas por centros diferentes, a veces múltiples, llamados secundarios, los cuales al ir creciendo y sustituyendo el cartilago circundante llegan a ocupar casi en su totalidad los extremos articulares del hueso.

Sobre la superficie de las epífisis y entre éstas y la diáfisis persiste una zona de cartilago especializado denominado "placa o cartilago de crecimiento", gracias al cual el hueso consigue aumentar su longitud hasta alcanzar sus dimensiones características.

El cartilago de crecimiento, histologicamente, es una zona de intensa

multiplicación de condrocitos, que bioquímicamente se caracteriza por una elevada síntesis de grandes moléculas del grupo de los proteoglicanos, responsables entre otras de la estructuración de la trama ósea.

Durante el crecimiento del hueso, ambos procesos: proliferación celular y síntesis de macromoléculas, se encuentran perfectamente compensados, de forma que, pese a la constante neoformación ósea, exista siempre una altura de cartilago que permita la continuación del proceso. El aumento de los niveles circulantes de esteroides sexuales, tras la pubertad, al bloquear la proliferación del cartilago y producir su desaparición, va a poner fin al crecimiento longitudinal del organismo. Conjuntamente, otro hecho determina el término del crecimiento activo del hueso: unión de epífisis y diáfisis, que representa la fusión en un sólo elemento óseo de varias unidades óseas, evolucionadas por separado en el mismo modelo cartilaginoso o mesenquimal, que crece durante todo el proceso.

Este proceso de crecimiento extensivo a todas y cada una de las unidades del esqueleto conduce, efectivamente, a un aumento del modelo del cuerpo (ya hemos mencionado que el crecimiento somático se va a producir, fundamentalmente, a expensas del crecimiento óseo), sin embargo las proporciones de este modelo resultarían radicalmente alteradas sin un control genético. Es necesario, además, que el crecimiento del hueso se produzca de manera coordinada con el crecimiento de los otros tejidos (junto con la evidente coordinación entre el crecimiento de las diferentes piezas óseas).

Hasta el momento, hemos considerado al hueso como un tejido aislado del entorno pero es evidente que estos patrones de crecimiento del hueso, predefinidos sin duda bajo un control esencialmente genético, pueden ser también matizados por el ambiente no sólo interno (vascularización, tejidos adyacentes y fuerzas mecánicas originadas fundamentalmente por el movimiento, hormonas y factores de crecimiento), sino también por factores ambientales externos.

En este sentido tampoco debemos olvidar que esta capacidad del entorno para modificar el hueso es efectiva tanto sobre el proceso de modelado óseo por el que los huesos crecen, adquieren o mantienen una determinada forma durante la infancia y etapa juvenil del individuo, como sobre el proceso de remodelado óseo que se produce durante toda

la vida del animal.

La existencia de este proceso de remodelado óseo continuo y permanente no es de extrañar ya que anteriormente hemos comentado que, a pesar de su rigidez, el tejido óseo no se desarrolla, crece y luego permanece inmutable. Por el contrario, aunque el crecimiento longitudinal del organismo se detiene tras la pubertad, se requiere durante toda la vida del individuo la renovación continua de hueso "viejo" por "nuevo", neutralizando el desgaste y fatiga de los constituyentes del hueso sometidos a continuas tensiones y, por lo tanto, permitiendo el mantenimiento de una masa y morfología ósea determinadas. Este es el objetivo que persigue la **remodelación ósea**, proceso dependiente de la acción concertada de osteoclastos y osteoblastos (**Farley y cols., 1987**); y que participa además en la homeostasis del calcio ya que conduce a la liberación al plasma de este mineral, así como a la homeostasis de los constituyentes de la matriz ósea. Pero, además de que este proceso de remodelación permita al hueso ajustarse a los diferentes requerimientos derivados de su propia función básica de tipo arquitectónico, también le posibilita adaptarse a los derivados de otra función igualmente básica, de tipo motor, al servicio de la actividad física del organismo, proporcionando al tejido óseo un cierto grado de plasticidad en su respuesta. Esta plasticidad debe ser garantizada mediante mecanismos reguladores, que modifiquen o maten la expresión del control genético más rígido. Veremos más adelante que esta regulación incluye factores locales de tipo mecánico y factores hormonales.

Aunque la remodelación ósea muestra diferencias según se trate de hueso laminar compacto o laminar esponjoso, se mantiene una secuencia de actuación de ambos elementos celulares que constituye la base del concepto de "acoplamiento", según el cual existe una coordinación tanto espacial como temporal entre la reabsorción y la formación de hueso. Así una actividad de reabsorción demasiado intensa se relaciona con una pérdida de la actividad inductiva del hueso tal y como observan **Wlodarski y Kobus (1992)**.

En resumen, el hueso es un tejido vivo cuyas células se nutren, respiran y desempeñan funciones específicas; configurando todo ello su propio metabolismo. Un metabolismo que consiste, principalmente, en un proceso continuo de reabsorción y nueva formación. Durante la remodelación ósea del hueso ya maduro, en el animal adulto, dichas funciones metabólicas de reabsorción y nueva formación son muy semejantes a aquellas que

permiten el desarrollo y crecimiento del tejido durante las correspondientes fases de vida en el animal infantil y que hemos comentado anteriormente.

Pero el hueso no debe poseer sólo las características mecánicas y físicas necesarias para constituirse en el soporte estructural del individuo, ni exclusivamente proporcionar los puntos de apoyo para la inserción de la musculatura con la posibilidad de que su estructura pueda ser modificada en función de la actividad física del sujeto. Como se discutirá con profundidad más adelante, el hueso interviene directamente en el control mineral del organismo constituyéndose en reserva y fuente de minerales, supeditando su propio metabolismo al metabolismo general. Una vez más, deben existir en este tejido procesos metabólicos que permitan un adecuado recambio de ciertos minerales con el medio interno y de acuerdo con las diferentes demandas orgánicas. Estos procesos metabólicos deben ser, en consecuencia, susceptibles de regulación hormonal.

Como acabamos de discutir crecimiento/reposición, actividad muscular y metabolismo general son funciones que concurren en el metabolismo óseo e implican distintos tipos de regulación. Las funciones óseas son de doble naturaleza, mecánico-motoras y metabólico-minerales, y el hecho de que puedan modificar el metabolismo óseo a través de mecanismos hormonales y locales hace a este tejido susceptible de ser influido por factores ambientales de cualquier naturaleza.

2.3. ACCION MUSCULAR SOBRE EL METABOLISMO OSEO

La regulación local, a la que en ocasiones nos hemos referido como mecanismo para adecuar la remodelación ósea a las distintas funciones mecánicas, corresponde a una acción específica ejercida desde el músculo. Se ha observado que cuando un hueso sufre una lesión, la velocidad de remodelación en la zona afectada es superior a la actividad ordinaria (Mueller y cols., 1991), todo ello con la finalidad de potenciar la reacción de defensa por parte del tejido no afectado. Este fenómeno resulta interferido por la inmovilización del hueso lesionado (Mueller y cols., 1992) poniéndose de manifiesto su dependencia de una acción mecánica y, por consiguiente, la importancia de la actividad muscular sobre el turnover del hueso.

Por supuesto que la determinación de la forma primaria posee un carácter esencialmente genético, hecho que ha sido demostrado a través del cultivo de órganos y del trasplante experimental de tejidos esqueléticos embrionarios (**Williams y Warwick, 1985**). Por consiguiente, durante la primera etapa del desarrollo, cuando se está estableciendo la forma primaria del hueso, las influencias mecánicas debidas a la actividad de músculos asociados apenas pueden ser operativas, pero dado que los músculos se hacen activos durante la vida prenatal es posible que ejerzan esa influencia en el desarrollo del hueso, si bien es difícil estimar hasta qué punto.

Después del nacimiento y hasta la adolescencia, antes de que todas las epífisis se fusionen, el aumento del uso de los músculos parece aumentar el desarrollo de los huesos, tanto en longitud como en circunferencia y así, recientemente, numerosos estudios han centrado su interés en la posible intervención de fuerzas mecánicas en el mantenimiento de una velocidad normal de remodelación ósea, tanto en animales adultos como en aquellos que están en período de crecimiento (**Kiliaridis y cols., 1992**). En estos últimos, la ausencia de estas fuerzas mecánicas sobre el hueso mediante inmovilización, denervación o tenotomía, conduce a una pérdida temporal de masa ósea en los miembros afectados (**Wronski y Morey, 1982; Globus y cols., 1984, 1985; Tuukkanen y cols., 1991**). También en niños la actividad física es un importante determinante del desarrollo de la masa ósea y, así, cuando son sujetos de determinadas enfermedades que conllevan una disminución de la movilidad corporal (poliartritis crónica infantil) manifiestan una pérdida significativa de hueso (**Kotaniemi y cols., 1993**). Otros interesantes trabajos se centran de forma específica en la importancia de la función muscular sobre la morfología dentofacial (**Bresin y cols., 1994**) y el crecimiento craneofacial (**Staley y cols., 1994**), incluso en situaciones donde previamente existe un desequilibrio metabólico del hueso en la rata (**Kiliaridis, 1989; Kiliaridis y cols., 1992**). Interesantes son también, en este contexto, estudios sobre la repercusión en el hueso de la ausencia de gravedad durante los vuelos espaciales (**Jee y cols., 1983**).

Por consiguiente, las acciones mecánicas ejercidas por los músculos conducen en un grado excesivo o, por el contrario, insuficiente a una alteración del crecimiento del hueso y a una marcada modificación de la masa ósea (**Bayers y Macmillan, 1970; Wronski y Morey, 1982; Halloran y cols., 1988**).

Sin embargo, aún permanecen sin respuesta numerosas cuestiones acerca de la exacta relación entre la actividad física y su efecto sobre el hueso tal y como menciona **Chesnut (1993)**, entre ellas el mecanismo molecular de la transducción de estas fuerzas en acontecimientos bioquímicos, hoy por hoy desconocido aun cuando se ha constatado la acción de dichas fuerzas en una gran variedad de células (**Harrell y cols., 1977; De Witt y cols., 1984; Ngan y cols., 1988**) provocando respuestas biomecánicas y estructurales, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Binderman y cols. (1988) proponen un modelo en el cual las fuerzas mecánicas perturbarían la membrana de fosfolípidos con la consiguiente liberación de ácido araquidónico y síntesis de prostaglandinas. Recientemente, se ha sugerido además la activación de la vía de los fosfoinosítoles (**Sandy y cols., 1989; Sandy y cols., 1993**). No obstante, a la vista de todos estos resultados, parece obvio que la activación de los músculos, y por consiguiente de su metabolismo, afecte al metabolismo óseo debiendo existir algún tipo de comunicación química entre ambos tejidos. En este sentido, se ha propuesto que factores locales, aún no identificados (posiblemente citoquinas, factores de crecimiento y leucotrienos), con una acción autocrina o paracrina, puedan mediar el efecto de estas fuerzas mecánicas sobre la remodelación ósea (**Saito y cols., 1991**).

2.4. REGULACION ENDOCRINA DEL METABOLISMO MINERAL EN EL HUESO

En cuanto a la relación del metabolismo óseo con el metabolismo mineral, el esqueleto no se erige sólo como un mero almacén mecánico. La adaptación al medio dulceacuícola y posteriormente al medio terrestre, en los cuales la concentración de calcio es muy inferior a la necesaria para la actividad biológica, condujo a los vertebrados a perfeccionar su reservorio de calcio, así como de fósforo y magnesio, y a desarrollar simultáneamente sistemas cada vez más especializados para regular sus niveles plasmáticos. De esta forma, el esqueleto se constituye en una reserva dinámica y fuente de elementos químicos que desempeñan funciones esenciales. Así, en los mamíferos, más del 95% del calcio, 85% del fósforo y más del 50% del magnesio total se localizará en el esqueleto óseo.

Dada la importancia fisiológica de estos minerales, las hormonas reguladoras de sus concentraciones plasmáticas adquieren una importancia vital y al ejercer dicha función se convierten, a su vez, en responsables de la regulación del volumen óseo, manteniendo un balance continuo entre las velocidades de formación y reabsorción del hueso.

Conviene recordar, someramente, la importancia de estos tres elementos químicos para, a su vez, comprender el valor de esta función de regulación mineral ejercida por el tejido óseo.

El calcio como mensajero intracelular ejercerá una acción de eslabón clave en procesos tan diversos como la contracción muscular, actividades enzimáticas en el metabolismo de los hidratos de carbono, transporte de electrólitos, crecimiento celular y, además, en todos los procesos de exocitosis que comprenden: la neurosecreción, la liberación de productos exocrinos y las respuestas hormonales y paracrinas. Cambios en su gradiente a ambos lados de la membrana plasmática y, en especial, pequeñas variaciones en su concentración citosólica, serán empleados como mediadores en el mecanismo de acción de múltiples mensajeros extracelulares.

En relación con el fósforo, es el principal tampón citoplasmático y un componente fundamental en la estructura del hueso, de las membranas y ácidos nucleicos. Los ésteres de fosfato son esenciales en los procesos de almacenamiento y liberación de energía, y los iones fosfato son necesarios en el metabolismo de los tres principios inmediatos, al actuar como cofactores de sistemas enzimáticos.

Por su parte, el magnesio interviene en la generación y transmisión del impulso nervioso, contracción muscular, liberación de parathormona, respuesta de los receptores óseos a esa hormona, y transporte de iones a través de la membrana plasmática. Asimismo, actúa como cofactor de diversos sistemas enzimáticos como los involucrados en la hidrólisis y transferencia de grupos fosfato, reacciones de síntesis de proteínas, grasas y carbohidratos y, reacciones en las que interviene el ATP. Además actúa como reordenador espacial en la estructura de las membranas celulares y ribosomas.

Por lo que respecta a los niveles plasmáticos de fosfato y magnesio, no

parecen depender en gran medida de ninguna acción hormonal y sí del filtrado y del umbral para su excreción renal. Por otra parte, sus niveles circulantes no están regulados tan estrechamente como los del calcio.

Por lo tanto, de entre los tres elementos químicos, el control de los niveles plasmáticos de calcio iónico dentro de límites estrechos supone el hecho más esencial. Estos niveles circulantes se mantienen a pesar de amplias variaciones en la dieta, crecimiento óseo y remodelación.

El calcio plasmático y el de los fluidos tisulares se halla en constante equilibrio con las sales cálcicas del hueso, se ha postulado que aproximadamente una cuarta parte del calcio iónico plasmático se intercambia cada minuto. Este equilibrio resulta esencial no sólo desde el punto de vista del mantenimiento de los niveles plasmáticos del calcio, sino también en relación a la propia fisiología del hueso como pone de manifiesto el efecto inhibitorio de bloqueantes de los canales de sodio/calcio (nifedipina) sobre el turnover del hueso y la actividad de la placa epifisaria de crecimiento (**Duriez y cols., 1993**).

Los canales de Havers y sistemas de lagunas y canaliculos óseos permiten que amplias áreas de sales del hueso se expongan a dichos intercambios. El contenido cálcico del tejido óseo más recientemente formado es más lábil que el de regiones más antiguas, y el proceso de sustitución de osteonas maduras por nuevas, que se produce durante toda la vida, constituye una reserva de iones de calcio fácilmente obtenibles. Se ha propuesto que la liberación de sales depende, en cierta manera, de la modificación activa de la matriz extracelular, a cargo de osteocitos vecinos (**Williams y Warwick, 1985**), pero se desconoce hasta que extremo esta osteolisis celular activa contribuye al recambio continuo y rápido del calcio.

Este proceso por el cual se mantiene un intercambio de calcio permanente es, como vemos, multifactorial con la participación del componente mineral del hueso y de las células óseas, pero además con el control ejercido por las hormonas paratiroidea (PTH) y calcitonina, así como por el efecto especialmente importante de la vitamina D. También intervienen otras hormonas, no directamente relacionadas con la regulación mineral pero que, debido a su acción específica sobre el metabolismo y crecimiento global del

organismo, afectan indirectamente al metabolismo óseo.

2.4.1. EFECTOS DE LA PARATHORMONA Y DE LA VITAMINA D

Cuando tiene lugar una disminución en el nivel de calcio iónico circulante se produce un aumento de la secreción de hormona paratiroidea, que a su vez ocasiona un aumento de la calcemia mediante varios mecanismos, principalmente por acción directa sobre el hueso, pero además por un aumento de la reabsorción de calcio en el túbulo renal, y finalmente, aunque en menor medida, al aumentar la absorción intestinal de este ión aunque este efecto, como veremos, es indirecto mediado por la vitamina D.

Tanto esta hormona como la calcitonina, conjuntamente con los metabolitos de la vitamina D, ejercen su acción reguladora de las concentraciones circulantes del calcio actuando sobre esos tres órganos diana. Dos de ellos controlan la "entrada" y "salida" de este ión, nos referimos evidentemente al intestino y al riñón. Por su parte, el hueso actúa como el principal depósito y fuente de calcio, y por la importancia que tiene en nuestro trabajo será el primero en ser comentado.

Sobre el **tejido óseo** esta hormona peptídica, producida por las células principales de las glándulas paratiroides, ejerce dos acciones aparentemente antagónicas. Así, por una parte estimula la reabsorción ósea y, por otra, favorece la formación de nuevo hueso. Este efecto anabolizante se manifiesta a bajas dosis fisiológicas, *in vitro* e *in vivo*, sobre el hueso tanto esponjoso como compacto (**Dempster y cols., 1993**), muy probablemente mediado por factores locales como el factor de crecimiento óseo (**Canalis y cols., 1991**). Esta acción constituye, posiblemente, una acción de mantenimiento en condiciones de secreción basal de la hormona.

Sin embargo, cuando estimulada por una caída de la calcemia la secreción de parathormona es aumentada, se produce la acción estimulante de la reabsorción ósea que se lleva a cabo en dos fases. En una de ella, la parathormona incrementa la movilización o salida de calcio desde aquellas zonas del hueso que mantienen un equilibrio dinámico continuo con el fluido extracelular. En otra fase, incrementa el número de núcleos de los osteoclastos y

estimula en estos la síntesis de ARN y de enzimas lisosómicas, todo ello es indicativo de una actividad osteoclástica aumentada, inhibiendo además la actividad de los osteoblastos y la producción de colágeno. A través de todas estas acciones la parathormona estimula la reabsorción ósea y favorece la movilización de calcio óseo.

Si bien sólo se ha podido demostrar receptores para hormona paratiroidea en los osteoblastos y los osteocitos pero no en los osteoclastos, puede afirmarse que la formación de AMPc por un lado y el incremento en la concentración intracelular de calcio por otro, constituyen sus mediadores intracelulares (Löwik y cols., 1985). Por otra parte la presencia de receptores para PTH en osteoblastos apoya la idea de estos como intermediarios de la reabsorción.

Sobre el riñón, la parathormona incrementa la reabsorción de calcio a través del sistema de la adenil ciclase-AMPc, postulándose además la participación del citoesqueleto al ser antagonizada la acción de esta hormona, tanto en riñón como en el hueso, por sustancias inhibitoras de la polimerización de la tubulina.

Otra acción importante de la parathormona en el riñón es favorecer la síntesis de calcitriol (1,25-(OH)₂-colecalfiferol), el metabolito más activo biológicamente de la vitamina D. Esta acción es ejercida al estimular la actividad de la enzima más importante en la formación de ese metabolito a partir de dicha vitamina, siendo de esta forma clave en su regulación. Esta estrecha relación entre PTH y calcitriol es el motivo por el que comentamos en un mismo apartado ciertos aspectos del papel de este metabolito de la vitamina D.

En el hueso, *in vitro* e *in vivo*, el calcitriol incrementa la reabsorción ósea al parecer estimulando la formación de osteoclastos a partir de sus células progenitoras. En este efecto dicho metabolito y la hormona paratiroidea se potencian mutuamente, toda vez que ésta última aumenta la actividad de estas células. Resulta discordante, sin embargo, la incertidumbre acerca de la existencia de receptores para este metabolito en los osteoclastos, por lo que parece probable que induzca la liberación por los osteoblastos, que sí los tienen, de un hipotético factor estimulador de la actividad de los osteoclastos.

Por otra parte, el calcitriol estimula indirectamente una correcta mineralización ósea, muy probablemente por la síntesis secundaria en estas células de

osteocalcina (Ikeda y cols., 1992).

En el riñón, los metabolitos de la vitamina D facilitan la reabsorción de calcio e incrementan la respuesta del túbulo a la parathormona. La administración de vitamina D induce la síntesis de una "proteína ligadora de calcio" en el túbulo contorneado distal y en el túbulo colector, puntos de acción de la hormona paratiroidea (Norman y cols., 1982).

En el intestino aumenta la absorción de calcio al favorecer la síntesis de proteínas que participan en el transporte de este ión a través del borde luminal de las células intestinales. A través de esta acción es como la PTH ejerce una acción, aun cuando indirecta, sobre el intestino. Cuando la concentración de este metabolito de la vitamina D se encuentra aumentada, como sucede durante el crecimiento, embarazo o lactancia (Herrera, 1988), se produce un aumento concomitante del nivel de calcitonina para proteger al esqueleto de la acción de la vitamina D en el intestino.

2.4.2. REGULACION POR CALCITONINA

Si por el contrario se produce un aumento de los niveles circulantes de calcio, se favorece la secreción de **calcitonina** por parte de las células parafoliculares del tiroides, que ocasiona, a su vez, una disminución en los niveles circulantes de calcio por un mecanismo directo sobre el hueso.

La calcitonina regula y/o inhibe la reabsorción ósea y permite el mantenimiento de la masa ósea. Sobre los osteoclastos causa una reducción de su número y de su actividad. La intensidad de esta acción viene determinada por el grado previo de reabsorción, siendo mayor cuando dicha reabsorción ósea es intensa, más si se mantiene la causa de la reabsorción ese efecto de la calcitonina se reduce paulatinamente hasta desaparecer. También es posible que ejerza un efecto sobre los osteoblastos, ya sea indirectamente a través de los osteoclastos o mediante la estimulación de la formación ósea (Baron y Saffar, 1977). La trascendencia de su papel fisiológico, sin embargo, ofrece ciertas dudas dado que no se ha demostrado ninguna alteración bioquímica significativa o duradera secundaria al exceso o defecto cuantitativo de esta hormona.

A dosis farmacológicas, sobre el riñón, inhibe la reabsorción de calcio potenciando la hipocalcemia secundaria a su acción en hueso.

Parathormona y calcitonina, ambas como hormonas calcitotrópicas por excelencia, y los derivados metabólicos de la vitamina D van a llevar a cabo, como hemos visto, su acción reguladora del metabolismo mineral actuando de forma específica sobre el metabolismo óseo. El equilibrio existente entre formación y reabsorción del hueso, fundamento del proceso de remodelación ósea, y su desplazamiento en uno u otro sentido, permite al hueso servir a esta regulación mineral respondiendo a las necesidades del individuo, y depende del justo equilibrio entre la secreción de estas dos hormonas y la disposición de vitamina D. Recordemos a este respecto la importante particularidad que muestra la vitamina D de ser sintetizada en la piel en una reacción catalizada por la luz ultravioleta.

2.4.3. PARTICIPACION DE HORMONAS NO DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON EL METABOLISMO MINERAL

Conjuntamente con las hormonas mencionadas, es necesario tener en cuenta, la presencia de otras hormonas que, fisiológicamente, condicionan los procesos de formación y reabsorción ósea, si bien no de forma específica. Son hormonas que al ejercer, entre otros efectos, acciones sobre el crecimiento global, acogen en su radio de acción al tejido óseo como otro de sus tejidos diana. Es el caso de las hormonas tiroideas, esteroides gonadales, hormona de crecimiento y glucocorticoides adrenales.

Nos limitamos a una leve mención de su implicación en el tejido óseo salvo en el caso de los últimos, a los que ya prestamos una atención especial en el correspondiente apartado.

Las **hormonas tiroideas** estimulan la síntesis de numerosas proteínas estructurales y enzimas en todas las células, incluidos osteoblastos y osteoclastos. Regulan la producción y metabolismo de numerosas hormonas proteicas, de las cuales la hormona de crecimiento hipofisaria es especialmente sensible a su acción. Las consecuencias de este efecto

son evidentes en la disminución del crecimiento somático que acompaña al hipotiroidismo, cuando ocurre en el periodo de crecimiento, causando alteraciones en los centros de osificación de las epífisis del hueso y retraso de la osificación. Aunque las cifras plasmáticas de calcio y fosfato suelen mantenerse dentro de límites normales, las de fosfatasa alcalina, empleadas como marcador de la formación de hueso, se hallan reducidas en el hipotiroidismo infantil y juvenil. No sólo se constatan alteraciones óseas en situaciones de hipotiroidismo sino también cuando los niveles de hormonas tiroideas en sangre son elevados, en cuyo caso inducen un aumento del turnover del hueso y la consiguiente reducción de la densidad ósea y riesgo de osteoporosis (**De Menis y cols., 1992**).

Los **esteroides gonadales** también intervienen en la formación y reabsorción ósea, estudios recientes muestran como la densidad ósea (contenido mineral del hueso) se incrementa marcadamente durante la pubertad y se ha sugerido que este aumento es debido al concomitante incremento en los niveles de esteroides sexuales circulantes (**Mazess y Cameron, 1971; Rüs y cols., 1985; Gilsanz y cols., 1988**). Apoya esta interpretación el hecho de que pacientes con hipogonadismo a menudo poseen cantidades deficientes de masa ósea que puede ser revertido mediante terapia con hormonas sexuales (**Smith y Walker, 1977**).

El mecanismo por el que los esteroides sexuales incrementan la formación de hueso durante el crecimiento se desconoce. La opinión general es que, mientras los estrógenos inhiben la reabsorción ósea, la testosterona puede incrementar la formación ósea. En la mujer, los estrógenos previenen la pérdida de hueso que frecuentemente acompaña a la menopausia (**Nuti y Martini, 1993**), al menos en parte por inhibición de la reabsorción ósea (**Riggs y cols., 1972**). Conocidos son los efectos que la menopausia tiene en la incidencia de osteoporosis por la caída concomitante de estrógenos, a lo que también contribuye la ausencia de progesterona a la que se ha asociado una acción positiva sobre la formación de hueso. No está comprobado sin embargo que los estrógenos induzcan la formación ósea, por el contrario **Turner y cols. (1990, 1993)** observan que el tratamiento con estrógenos no sólo inhibe la reabsorción de hueso sino también su formación por los osteoblastos y apuntan a que la reducción de los niveles de estrógenos durante la menopausia en humanos o por ovariectomía en humanos y en ratas incrementa tanto la formación como la reabsorción ósea (**Turner y cols., 1987**), siendo esta estimulación del turnover del hueso, la causa de la pérdida

acelerada de masa ósea observada en tales situaciones (**Danielsen y cols., 1993; Mosekilde y cols., 1993**).

Respecto a los andrógenos, la administración de testosterona a ratas conduce a una aceleración de la maduración de las células del cartílago, incremento de las reservas de glucógeno y ampliación de la zona calcificada de los discos epifisarios (**Fahmy y cols., 1969**). Además, se ha obtenido en aves tratadas con andrógenos un incremento en la relación calcio/hidroxiprolina en huesos frontales, indicando una más rápida maduración de la matriz ósea (**Puche y Romano, 1968**).

Es interesante, por otra parte, destacar que *in vitro* las respuestas de las células del hueso y del cartílago a los esteroides sexuales pueden ser afectadas de forma selectiva por las interacciones mutuas entre estos y las hormonas calcitotrópicas que hemos citado anteriormente a través de diversos mecanismos, tal y como observan **Sömjen y cols. (1990)**. También *in vivo* se pone de manifiesto que la presencia de factores locales o sistémicos son importantes para determinar como responden las células del hueso a los esteroides sexuales y así lo muestra, en el estudio realizado por **Turner y cols. (1990)**, la diferente y acusada respuesta, tras la ovariectomía, de los osteoblastos a los estrógenos según éstos se localicen en el periostio o en el endostio de la diáfisis tibial, inhibiéndose la formación de hueso en la superficie periostial y no observándose tal efecto en la superficie endostial.

La **hormona de crecimiento** ejerce una serie de efectos biológicos que de forma integrada conducen al crecimiento o bien permiten, una vez que éste ha finalizado, atender a las regulaciones metabólicas nutricionales del organismo.

En relación con el tejido óseo, esta hormona posee un efecto específico sobre su crecimiento, actuando en las células del cartílago de crecimiento. Es sobradamente conocido que en niños GH-deficientes se interrumpen los procesos de proliferación y transformación condrocíticos, estrechándose este cartílago. Procesos, todos ellos, que se restauran por el tratamiento con GH exógena. Asimismo, estudios en rata ponen de manifiesto que alteraciones en la longitud corporal y en el crecimiento craneal pueden ser paliadas, al menos parcialmente, por la administración de GH (**Bates y Holder, 1988; Oyhenart y Puccirelli, 1992**).

Esta acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal queda subordinada a la producción periférica, en tejidos tales como el hígado, de unos factores mediadores (somatomedinas) responsables últimos de dicha acción, estableciéndose entonces una relación GH-somatomedinas-crecimiento (Prieto, 1992). Sin embargo, de los datos obtenidos en rata, parece desprenderse la existencia de un sistema más complejo en el que la propia hormona sería responsable de una acción directa sobre el cartilago de crecimiento actuando sobre grupos celulares precursores de gran tamaño (precondrocitos), mientras que las somatomedinas inducirían preferentemente la proliferación de poblaciones de estadio más avanzado de maduración. Además de este efecto proliferativo, la GH estimularía directamente a los condrocitos diferenciados a producir somatomedinas, las cuales desencadenarían la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por mecanismos auto o paracrinós.

Esta inducción del crecimiento lineal del hueso por ambos efectores (GH y somatomedinas) se detiene una vez que se completa, tras la pubertad, la fusión de las epífisis, sin embargo persiste su efecto sobre el crecimiento del hueso en diámetro a expensas de la capacidad osteogénica del periostio.

2.5. EFECTOS AMBIENTALES SOBRE EL METABOLISMO DEL HUESO: ESTRES Y ALTERACIONES OSEAS

Durante el desarrollo y el crecimiento, las estructuras corporales, entre ellas los huesos, se hallan influidas por factores genéticos y por factores de carácter metabólico, responsables, como hemos mencionado, de un cierto grado de plasticidad a la hora de que las funciones desempeñadas por estas estructuras se ajusten a las demandas del organismo en el que se integran.

Sobre esta interacción de factores, los agentes ambientales externos son capaces de ejercer una acción severa sobre el desarrollo. En el caso de las estructuras óseas, esta acción ambiental podría expresarse a través de la relación entre músculo y hueso o bien a través de la modificación de alguno de los mecanismos de regulación hormonal que acabamos

de analizar. Respecto a la primera vía de incidencia, resulta obvio que la realización de una actividad física específica ligada a las condiciones del entorno natural o social del individuo altera esa interacción entre el músculo y el hueso y conduce a modificaciones de los huesos específicos implicados en la ejecución de dicha actividad, potenciando su masa y características mecánicas. El estudio realizado por **Bayendor y Martin (1989)** puede ilustrar lo que acabamos de comentar. Estos investigadores realizaron un análisis de la división sexual de las labores en una población prehistórica denominada Anasazi. En este estudio se midieron la longitud, diámetro y circunferencia de los principales huesos largos (fémur, tibia, clavícula y húmero), calculándose la estatura y robustez de los individuos adultos. Los resultados obtenidos sugieren que los Anasazi que ocuparon la región americana de Black Mesa eran significativamente dimórficos sólo en estatura, mientras que todas las medidas de robustez fueron muy similares. Los autores interpretan esta similitud como el resultado de que tanto hombres como mujeres participaban en la ejecución de labores, posiblemente de diferente naturaleza, pero que exigían sin embargo una cantidad igual de fuerza física.

En muchas ocasiones tales modificaciones óseas se producen, no por una incidencia directa sobre la interacción músculo/hueso, sino que son consecuencia de que la alteración ambiental se convierte por definición en estrés y los efectos sobre el hueso son mediados entonces por el correspondiente aumento de los glucocorticoides circulantes y/o las restantes alteraciones hormonales sujetas al SGA. No sólo las alteraciones ambientales externas pueden ser calificadas como situaciones de estrés para el individuo, también una alteración de su medio interno (enfermedades, infecciones, estados carenciales) puede convertirse en una situación generadora de estrés. Más aún si ese desequilibrio de su homeostasis interna es consecuencia de una alteración ambiental externa, con lo cual la intensidad del estrés se acentúa (**Martin y cols., 1991**).

Desde esta perspectiva, no resulta tan controvertido el hecho de que tanto una actividad física no entrenada como una inactividad muscular por inmovilización conduzcan, siendo ambas situaciones opuestas, a una pérdida de masa ósea y cuando, además, se ha asociado al aumento de la acción muscular un efecto potenciador de la masa del hueso. Esta convergencia en los efectos sobre el hueso se explica si ambas situaciones se convierten en estresantes al superar los límites de la normalidad sin que exista una adaptación del organismo, en cuyo caso la implicación de los glucocorticoides inhibiendo la formación ósea resulta

evidente (Gallagher y cols., 1973; Dietrich y cols., 1979; Hahn y cols., 1979).

A este respecto, tanto la inmovilización (Beaulieu y cols., 1987; Gíralt y cols., 1987; Stepanovic y cols., 1988) como el ejercicio físico intenso (Bargiel y cols., 1981; Smythe y cols., 1983) son modelos de estrés clásicamente utilizados.

A la vista de todo lo comentado y en relación con las estructuras óseas, la importancia crítica que la interacción de la información genética y del ambiente ejerce sobre el normal desarrollo de éstas es corroborada por los numerosos estudios efectuados, especialmente, sobre las piezas dentales. Tenczar y Bader (1966), en experimentos efectuados en ratón, muestran que de un 21% a un 29% de la variación en la anchura de los segundos molares mandibulares es debido a factores prenatales no genéticos. Un valor similar es aportado por Leamy y Bader (1968).

Factores físicos, químicos, nutricionales u otros agentes ambientales perturbadores, pueden provocar alteraciones en las condiciones de los tejidos adyacentes al diente que, a su vez, afecten a la estabilidad o expresión de la información genética relacionada con el adecuado desarrollo dental (Barden, 1980). Por ejemplo, la insuficiencia de vitamina A (Paynter y Grainger, 1956), la restricción calórica (Shaw, 1970a,b) y la deficiencia de proteínas (DiOrio y cols., 1973) ejercen influencia en el tamaño de las piezas dentales de ratas. De forma análoga, diversos estudios (Goose y Lee, 1973; Anderson y cols., 1975; Bailit, 1975) subrayan el impacto del ambiente en la maduración de la dentición humana.

Tanto los estudios realizados en animales como en el hombre indican un mayor efecto prenatal que postnatal de dichos factores ambientales, afectando de forma adversa al crecimiento de las piezas dentales y a la simetría bilateral de la arcada dental (Paynter y Grainger, 1956; Riesenfeld, 1970).

Este último parámetro dental, y su modificación por el ambiente, ha sido objeto de diversos estudios (Saunders y Mayhall, 1982). Todos los sistemas biológicos que exhiben simetría bilateral se caracterizan por poseer un cierto grado de "fluctuación asimétrica" en sus dimensiones. Este término, "fluctuación asimétrica", hace referencia a variaciones métricas aleatorias, no direccionales (Van Valen, 1962), reflejo de alteraciones en

la sincronización del crecimiento de aquellas estructuras que la presentan.

En el caso de las piezas dentales, esta condición se incrementa no sólo con el grado de consanguinidad (**Niswander y Chung, 1965; Suarez, 1974; DiBennardo y Bailit, 1978**), sino también por la acción de factores ambientales que interfieren en la morfogénesis del diente: estados de enfermedad (**Bailit y cols., 1970**) o agentes estresantes (temperatura, ruido, alteración de la dieta y ciertos agentes químicos) que ejercen su acción a través del ambiente intrauterino (**Siegel y Smookler, 1973; Siegel y Doyle, 1975a; Siegel y cols., 1977a; Brandt y Siegel, 1978; Sciulli y cols., 1979; Gest y cols., 1983**).

La exposición a una señal sonora intermitente y de elevada intensidad, durante la gestación y 21 días postparto, aumenta la fluctuación asimétrica de las dimensiones mediodistal y bucolingual del primer molar inferior en la rata (**Siegel y Smookler, 1973**). Similares incrementos en este parámetro fueron hallados tras la exposición a estrés audiogénico pre y postnatal por **Siegel y Doyle (1975a)**. No sólo el ruido como agente estresante sino también temperaturas elevadas (**Siegel y cols., 1977b**) e hipotermia (**Siegel y Doyle, 1975b**) han sido empleadas como modelos de estrés revelándose, en la rata, como agentes inductores del incremento de la fluctuación asimétrica en la misma pieza dental.

Además de las piezas dentales, otras estructuras óseas han sido objeto de estudio en relación con la incidencia del estrés. Estas investigaciones han abarcado no sólo el efecto del estrés sobre el incremento de la fluctuación asimétrica mostrada por los huesos largos de las extremidades (**Siegel y cols., 1977b; Gest y cols., 1983**) y por los huesos parietales (**Mooney y cols., 1985**), sino también sobre otras variables como el espesor del tejido óseo cortical del fémur (**Brandt y Siegel, 1978**). Este último estudio amplía el efectuado por **Riesenfeld (1976)** quien observó como el estrés por frío conduce a una significativa reducción del espesor de dicho tejido óseo en el fémur de la rata, haciendo extensivo este efecto a la acción de elevadas temperaturas.

Resulta interesante observar que esta reducción del espesor del tejido óseo cortical no se produce en los animales estresados por ruido. Estas diferencias también son halladas por **Siegel y Doyle (1975a,b)** al observar que las dimensiones dentales afectadas por

la exposición a ruido y a bajas temperaturas eran diferentes. Estos datos sugieren dos conclusiones: que un mismo agente estresante no afecta a todas las dimensiones óseas en el mismo grado y que distintos agentes estresantes pueden producir diferentes alteraciones óseas.

El estudio del incremento de la fluctuación asimétrica dental por el estrés ha proporcionado numerosas observaciones acerca de que no sólo la respuesta al estrés difiere según la dimensión considerada sino que también está condicionada por la posición que el diente ocupa en la arcada así como por su pertenencia a la maxila o a la mandíbula.

Una posible explicación a estos resultados sería que las piezas dentales más distales son relativamente menos estables que las más proximales (para una misma arcada), así como las situadas en la maxila lo son frente a los dientes de la mandíbula (**Siegel y Doyle, 1975a; Kieser y cols., 1986; Harris y Nweeia, 1980**), todo ello con independencia de la acción de los agentes estresantes. Sobre esta base, **Sofaer y cols. (1971)** declaran que esta menor estabilidad se debe a que poseen un mayor componente ambiental en su variación fenotípica y como consecuencia podrían ser más susceptibles a modificaciones en su desarrollo. De esta forma, el diente distal (frente al proximal) y el maxilar (frente al mandibular) podrían evidenciar mayor fluctuación asimétrica, reflejando de forma más significativa la acción de los agentes estresantes.

Hasta este punto, hemos expuesto una relación de diferentes alteraciones óseas inducidas por factores ambientales, así como de ciertas peculiaridades asociadas, probablemente, a la naturaleza del agente estresante, que una vez más cuestionan el tan pretendido carácter general de la respuesta al estrés. Sin embargo, nada se ha comentado en relación con los mediadores de esta acción ambiental sobre el metabolismo óseo.

El reiterado empleo del término "factor ambiental" y su connotación negativa en este contexto, nos conduce de forma inmediata a pensar en la implicación de la elevación de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, inherente a toda situación estresante. Efectivamente, este hecho es considerado por **Siegel y cols. (1977b)**, los cuales se fundamentan en la descripción por **Seyle (1973)** de un síndrome general de adaptación al estrés para proponer una hipótesis que explicase el incremento, debido a los agentes estresantes, en la fluctuación asimétrica observado tanto en las piezas dentales como en los

huesos largos. Sin embargo, estos autores hacen recaer el papel mediador en la elevación de los niveles de hormona paratiroidea como parte integrante de una relación entre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y la glándula paratiroides, y dado el efecto estimulador de la actividad osteoclástica de esta última. La actuación de la parathormona conduciría, finalmente, a una alteración de los niveles plasmáticos de calcio. Esta hipótesis también es sugerida por **Mooney y cols. (1985)** quienes evaluaron los efectos del estrés prenatal en un tercer modelo óseo o hueso membranoso, también dependiente de los niveles circulantes de calcio.

Sin embargo, **Brandt y Siegel (1978)** opinan que no hay un único factor implicado en las alteraciones óseas inducidas por el estrés, y sugieren, además de las modificaciones en los niveles plasmáticos de calcio, otros efectos del estrés tales como la disminución de la velocidad de mitosis y la reducción de la velocidad de síntesis proteica. Procesos tales, que pueden suponer la implicación de otros factores endocrinos relacionados con el crecimiento (GH), o con el metabolismo en general, hormona tiroidea y glucocorticoides.

Lo expuesto anteriormente nos conduce a pensar nuevamente que la hipersecreción de glucocorticoides adrenales, asociada al estrés, sea también responsable de una acción mediadora de todos estos efectos; considerando, además, la interrelación entre la producción hipofisaria de ACTH y GH. Como hemos comentado, el exceso de glucocorticoides causa una general supresión del crecimiento y desarrollo físico (**Navarro y cols., 1988; Navarro y cols., 1989; Avioli, 1993**). Estos efectos se extienden al tejido óseo donde inducen una reducción de la formación de hueso (**Gallagher y cols., 1973; Dietrich y cols., 1979; Hahn y cols., 1979; Hughes-Fulford y cols., 1992**) como frecuentemente se pone de manifiesto en situaciones clínicas como en el Síndrome de Cushing o en el tratamiento terapéutico de enfermedades asmáticas y artríticas (**Kotaniemi y cols., 1993; Olbricht y Benker, 1993**). Otros trabajos inciden asimismo en la posible implicación de las elevadas concentraciones de glucocorticoides, que se producen en respuesta a niveles tóxicos de drogas durante la gestación, en un crecimiento detenido y en alteraciones esqueléticas tales como la incidencia de paladar hendido así como de costillas con una morfología anómala (**LaBorde y cols., 1992**). También se apunta hacia los glucocorticoides en exceso como posibles mediadores de los efectos teratogénicos (costillas supernumerarias) observados cuando el estrés maternal se produce durante el periodo crítico de la organogénesis (**Beyer y Chernoff, 1986**).

Por otra parte, es de común aceptación que los cambios provocados por los glucocorticoides en el hueso y en la homeostasis del calcio son el resultado de un efecto directo sobre los osteoblastos (**Dempster, 1989**). Esta afirmación se basa en los bajos niveles plasmáticos de osteocalcina (indicador altamente sensible de la inactivación de estas células) hallados incluso durante la administración de bajas dosis de glucocorticoides (**Ekenstam y cols., 1988; Prummel y cols., 1991; Leech y cols., 1993**). Se postula que esta disminución de sus niveles en plasma sea debida a una acción directa de los corticosteroides sobre el gen promotor de la osteocalcina (**Morrison y cols., 1989; Ikeda y cols., 1992**).

Datos histomorfométricos permiten apuntar que, además, durante el tratamiento con corticosteroides se incrementa la reabsorción ósea (**Bressot y cols., 1979**). Sin descartar una posible acción directa sobre la secreción de PTH (**Fucik y cols., 1975**), del calcitriol (**Bikle y cols., 1993**) o de la vitamina D (**Chesney y cols., 1978**), generalmente se ha atribuido este hecho a un hiperparatiroidismo secundario causado por la reducida calcemia al disminuir la absorción intestinal de calcio (**Klein y cols., 1977; Hahn y cols., 1981**) e incrementarse su excreción urinaria (**Suzuki y cols., 1983; Prummel y cols., 1991**), aparentemente por efecto de los glucocorticoides.

Sin embargo, aunque la implicación de las hormonas calciotróficas, PTH y derivados de la vitamina D, como mediadores de las acciones de los glucocorticoides en la homeostasis mineral del hueso es ampliamente aceptada y, si bien algunos investigadores encuentran efectivamente elevados niveles plasmáticos de parathormona (**Fucik y cols., 1975; Hahn y cols., 1979; Suzuki y cols., 1983**), otros estudios no detectan modificaciones en este parámetro durante el tratamiento con glucocorticoides, ante lo cual se ha sugerido una posible acción de estos estimulando la reabsorción ósea vía PTH sin elevar sus niveles sino potenciando su acción en el hueso, tal y como sugieren estudios efectuados *in vitro* (**Hahn y Halstead., 1979**). Otros autores no sólo no observan modificaciones en los niveles de parathormona sino que, además, se mantienen inalterados los marcadores bioquímicos de reabsorción de hueso lo que, en consecuencia, sugiere que la osteopenia inducida por los glucocorticoides es debida a una reducción de la formación de hueso, no estando potenciada una acción de reabsorción ósea (**Prummel y cols., 1991**).

Además existe una nueva discrepancia entre los hallazgos que señalan incremento de la reabsorción ósea (**Bressot y cols., 1979**) y los que muestran inhibición *in vitro* por corticosteroides de los osteoclastos aislados; así **Tobias y Chambers (1989)** proponen que otros mecanismos indirectos, capaces de superar el efecto inhibitor propio de los glucocorticoides sobre los osteoclastos, serían los responsables de estimular la reabsorción ósea. Si el mecanismo implicado no es un incremento en los niveles circulantes de hormona paratiroidea, podría suceder que los esteroides estimulasen otras células capaces de reabsorción ósea, similares a macrófagos como sugieren **Teitelbaum y cols. (1981)**. De hecho, se ha observado la aparición de células gigantes multinucleadas, no identificadas como osteoclastos, próximas a implantes de matriz ósea, cuya intensa actividad no sólo conduce a una degradación del implante sino también a la de los péptidos morfogenéticos del hueso liberados durante el proceso de reabsorción ósea de manera que provocan, además, una pérdida de la actividad inductiva del hueso (**Wlodarski y Kobus, 1992**). En consecuencia, como podemos observar, el mecanismo a través del cual los corticosteroides ejercen un efecto sobre el proceso de reabsorción ósea, asociado con la producción de osteoporosis, permanece todavía incierto.

Este desconocimiento puede ser debido, al menos en parte, a la ausencia de modelos adecuados de animales de laboratorio para el estudio de esta patología, dado que el esqueleto de la rata y de otras especies de mamíferos son relativamente resistentes a la osteoporosis. En contraste, las aves (especialmente domésticas), debido a su elevada producción de huevos, exhiben de forma natural un cierto grado de osteoporosis (**Urist y Deutsch, 1960a**). Este desorden fisiopatológico acontece típicamente durante la puesta de huevos o inmediatamente después del periodo estresante de la reproducción, siendo potenciado fácilmente por los corticosteroides.

El empleo de estos animales como sujetos de experimentación resulta apto para el estudio del efecto del estrés y de la secreción aumentada de glucocorticoides sobre el metabolismo óseo. **Siegel y Latimer (1970)** observaron una reducción en el peso de la tibia, asociada a hipercalcemia, en respuesta a la exposición de pollos de gallina doméstica al frío.

En la codorniz, *Coturnix coturnix japonica*, ha sido seleccionada

genéticamente una línea (HS) debido a su exacerbada respuesta adrenal al estrés (**Satterlee y Johnson, 1988**), la cual se manifiesta en que la habitual producción de corticosterona, tanto frente al estrés como al estímulo con ACTH, es superior a lo normal. Estos animales desarrollan una significativa osteoporosis cuando son expuestas a diferentes y secuenciales situaciones estresantes (**Satterlee y Roberts, 1990**). Este efecto, tanto en machos como en hembras, aparece asociado a esa superior elevación de los niveles de corticosterona que exhiben estos animales en respuesta a los tratamientos estresantes empleados, hecho al que también se asocia la interrupción del crecimiento observada por **Satterlee y cols. (1982)**.

La osteoporosis inducida por **Satterlee y Roberts (1990)** en la codorniz HS se manifiesta en un aumento del porcentaje del volumen del tejido óseo cortical (análogo del tejido óseo compacto de mamíferos) ocupado por canales de Havers como consecuencia de un incremento del número de osteonas secundarias. Además, se produce una reducción general del espesor del tejido óseo cortical con evidencias de reabsorción a pesar de que no se detectan cambios en la actividad de los osteoclastos. Estas alteraciones óseas podrían ser, en opinión de los autores, el resultado directo de los elevados niveles de corticosterona plasmática que la línea HS muestra durante el periodo de estrés y que son, como hemos dicho, característica de su estirpe.

De hecho, estos cambios en la dinámica del tejido óseo cortical, puestos de manifiesto en esta línea HS, concuerdan con los observados por **Urist y Deutsch (1960a)** en hembras ponedoras tratadas con cortisona o con ACTH (**Urist y Deutsch, 1960b**). De forma parecida, dosis elevadas de corticosteroides adrenales se han asociado a la producción de osteoporosis en especies de mamíferos (**Gluckman y Shklar, 1955; Storey, 1961**), aunque con la resistencia relativa a esta alteración ósea antes comentada.

Otros parámetros óseos resultan, también, modificados por la administración de glucocorticoides o ACTH. **Huble (1957)** observa que en gallos en periodo de crecimiento la administración de acetato de cortisona inhibe la condrogénesis de los huesos largos, así como **Kowalewski (1958a,b)** constata la reducción de la incorporación de sulfato marcado radiactivamente en el tejido conectivo. Además, se ha hallado en jóvenes aves de corral una disminución del peso de la tibia, acompañada de hipercalcemia, en respuesta a la administración de glucocorticoides o ACTH (**Siegel, 1968; Siegel y Latimer, 1970**).

Otro hecho destacable, hallado por **Satterlee y Roberts (1990)** en la codorniz HS, es la drástica reducción de la producción de huevos por hembras estresadas. Efectivamente, el estrés crónico produce una hipofunción del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y conduce a la supresión de muchas funciones orgánicas relacionadas con la actividad sexual y reproductiva (**Armario y Castellanos, 1984; Jurcovicova y cols., 1984; López-Calderón y cols., 1987; Chatterton, 1990**). De hecho, la administración de corticosteroides ha sido empleada con la finalidad de inhibir la puesta de huevos en pollos de la estirpe White Leghorn (**Ruszler y cols., 1984**), de igual forma se ha observado que aves seleccionadas por su exagerada respuesta en los niveles de corticosterona frente al estrés muestran una disminuida velocidad de producción de huevos (**Brown y Nestor, 1973**).

Asociado a esta alteración de la función reproductora en la codorniz HS, **Satterlee y Roberts (1990)** encuentran un incremento de la cantidad de tejido óseo membranoso y una reducción del número de osteoclastos de este hueso, responsables primarios de la reabsorción ósea (**Parfitt, 1983**). Estos resultados son relacionados, por los autores, con la menor necesidad de liberar calcio de la reserva que constituye el tejido óseo membranoso, puesto que disminuyen las demandas de este mineral para la formación de cáscaras. En consecuencia, la asociación indirecta entre corticosterona y metabolismo del calcio sobre este tipo de tejido óseo se establecería a través de la capacidad de este corticosteroide para deprimir la función reproductora en las hembras. Sin embargo parece, cuanto menos, cuestionable la existencia, además, de un efecto directo de la corticosterona sobre el tejido óseo membranoso, sobre todo a la luz de los numerosos trabajos que constatan la implicación directa de los glucocorticoides en el metabolismo óseo.

Persisten, pues, las dudas suscitadas en relación con la identidad de los mecanismos implicados en las alteraciones óseas inducidas por estrés y si bien son evidentes, no suponen, sin embargo, impedimento para utilizar las variaciones óseas detectadas, especialmente en la magnitud de la fluctuación asimétrica dental y de huesos largos y parietales, como indicadores de estrés ambiental en poblaciones humanas (**Perzigian, 1977; Siegel y cols., 1977a; DiBennardo y Bailit, 1978; Harris y Nweeia, 1980; Saunder y Mayhall, 1982; Gest y cols., 1983**). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los niveles de fluctuación asimétrica en los huesos largos disminuyen con la edad, tanto en roedores

(Siegel y Doyle, 1975a), como en el hombre (Ruff y Jones, 1981). Hecho motivado, al parecer, por la remodelación funcional que acontece postnatalmente (Siegel y Doyle, 1975a). En este sentido, Gest y cols. (1983) han propuesto que cuando se establecen comparaciones entre poblaciones humanas de los niveles de fluctuación asimétrica de los huesos largos, es necesario siempre emplear grupos de edad equivalente. Por otra parte, también sugieren que este parámetro puede ser considerado sólo un indicador de estrés ambiental (enfermedad, alimentación...) en los individuos jóvenes, ya que en los adultos los niveles de fluctuación asimétrica pueden aparecer distorsionados por la remodelación ósea asociada a la función muscular, siendo en este caso, un buen indicador de la actividad o forma de vida desarrollada por la población.

No obstante, nosotros pensamos que esto es sólo aplicable a la comparación de poblaciones vivas. En el caso de las poblaciones antiguas, en los estudios paleoantropológicos cuando se hacen directamente sobre el resto óseo previamente datado, las muestras de la población a comparar deben ser de edades equivalentes, pero en los restos de individuos maduros y seniles, las fluctuaciones asimétricas óseas consideradas podrán ser indicadores, por supuesto, de la actividad realizada por la población pero también representarían al estrés ambiental que hubiese afectado a los individuos cuando estos fueron jóvenes.

A la vista de todos los datos hasta ahora expuestos, y a pesar de los numerosos interrogantes que plantean, parece lógico pensar que los glucocorticoides constituyen punto de paso importante de esta relación estrés-alteraciones óseas. Probablemente con una implicación no sólo directa, sino también actuando sobre otros sistemas de regulación endocrina tales como el responsable del control mineral, hecho que ya intuíamos dada la estrecha relación entre metabolismo mineral y óseo, proponiendo esta vía como una de las probables formas en que los factores ambientales ejercerían su acción sobre el hueso. Además, recordemos como los glucocorticoides son mediadores de modificaciones óseas, causadas por el estrés, al afectar otro sistema de regulación endocrina, en este caso responsable del control de la función reproductora en aves.

II. ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO: Justificación del diseño experimental

II. ANTECEDENTES, HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO: Justificación del diseño experimental

Vamos a plantear tres objetivos generales que se refieren al animal, a sus órganos y al esqueleto, respectivamente. En cualquier caso, expondremos unas premisas de partida, cuyo desarrollo y apoyo científico se encuentran en el capítulo de Introducción, propondremos una hipótesis y plantearemos su correspondiente objetivo, explicando a continuación el diseño experimental para conseguirlo. Cada uno de los tres objetivos generales se desglosan en varios objetivos parciales más concretos, los cuales se corresponden con los parámetros y técnicas analíticas que son explicadas con detalle en el capítulo de Metodología, en el que se ofrecen también los detalles del diseño experimental aquí elaborado o justificado.

1. REFERENTE AL ANIMAL

El estrés crónico provoca la alteración, de forma relativamente continua, de una serie de factores neuroendocrinos, entre ellos, los niveles circulantes de glucocorticoides producidos en la corteza adrenal. En este sentido, nuestro modelo de estrés crónico por exposición al ruido está suficientemente caracterizado respecto a la intensidad y dinámica de su respuesta corticoadrenal (Alario y cols., 1987a,b; Gamallo y cols., 1988).

Los factores neuroendocrinos referidos y los propios glucocorticoides tienen importantes efectos a nivel del metabolismo, crecimiento o maduración de los tejidos. Clásicamente se atribuyen a estos efectos las pérdidas de peso registradas por la exposición crónica al estrés que son expuestos en el SGA. Nosotros hemos registrado alteraciones en el peso corporal de machos adultos (Alario y cols., 1987b) y hembras gestantes (Velasco, 1990) por la exposición al ruido.

HIPOTESIS 1: Las alteraciones de peso registradas en animales expuestos al ruido pueden ser efecto directo de la elevada actividad glucocorticoide provocada por el ruido y el

grado de esas alteraciones debe estar correlacionado con la intensidad de esa actividad glucocorticoide.

OBJETIVO 1: Aunque inicialmente se partirá de las curvas de peso, nos proponemos valorar el estado dimensional del animal expuesto al ruido en relación con la intensidad de actividad glucocorticoide mediada por el estímulo. Para ello, deberemos comparar los resultados de la exposición al ruido con tratamientos que representen modelos con mayor intensidad de dicha actividad, pero que vayan excluyendo sistemáticamente escalones de activación del eje HHA, implícitos en el estrés, hasta representar directa y exclusivamente la actividad debida a la presencia de altos niveles circulantes de las hormonas.

DISEÑO EXPERIMENTAL: La intensidad de la actividad adrenal o de la acción glucocorticoide será evaluada a través de los niveles circulantes de corticosterona al final del tratamiento. Todos los parámetros corporales medidos en los animales expuestos al ruido se comparan con los de animales tratados directamente con ACTH o dexametasona:

- 1- Para la ACTH se utiliza una dosis que intensifica la producción adrenal de corticosterona provocada por el estrés pero que excluye el componente neuroendocrino, aunque no sus consecuencias: elevación de ACTH y corticosterona circulante.
- 2- La dexametasona es aplicada en una dosis que garantiza una actividad glucocorticoide mayor que la mediada por el estrés y por la administración de ACTH, pero que excluye el componente neuroendocrino y la liberación endógena de ACTH y corticosterona, la cual es sustituida por la dexametasona. En este caso la evaluación de la actividad glucocorticoide de la dexametasona mediante la medida de los niveles plasmáticos de corticosterona, se manifiesta en una reducción de dichos niveles.

Como referencia se utilizará el **grupo control** habitual y un grupo donde se comprueben **efectos conjuntos de la dexametasona y la exposición al ruido**. La utilización de este último tratamiento resultará muy útil para discernir efectos exclusivamente debidos a los glucocorticoides de aquéllos causados por otros factores de la exposición al estrés.

HIPOTESIS 2: ¿Las alteraciones de crecimiento encontradas en los animales de los diferentes tratamientos son reflejo de modificaciones en el desarrollo visceral?

OBJETIVO 2: Nos proponemos conocer si la actividad glucocorticoide representada por los tratamientos provoca alteraciones en el desarrollo de órganos relevantes y cómo contribuyen las mismas al crecimiento del animal completo.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Hay tres órganos clave en el funcionamiento orgánico:

- **Encéfalo:** Centro de control de todo el organismo, relacionado además directamente con la integración del estrés y con la puesta en marcha de los mecanismos neuroendocrinos vinculados al mismo.
- **Corazón:** Soporte funcional del reparto de nutrientes energéticos.
- **Riñón:** Importante participante en el control del medio interno.

Vamos a considerar el valor del peso fresco absoluto de cerebro, corazón y riñón de los animales de cada grupo experimental, y a compararlo con los restantes en función de su distinto nivel de actividad glucocorticoide. Para comprobar si las alteraciones encontradas se correlacionan con los cambios de crecimiento hallados en el animal, se comparará también el índice de cada órgano relativo al peso del animal.

Hipótesis 2a: Sucede que el crecimiento de cada estructura, órgano, aparato o sistema no es continuo ni constante, por lo que, en un momento dado, cada parte del animal puede presentar una diferente sensibilidad a que su crecimiento sea alterado por cualquier factor o por uno en particular. Conocer si existe esa diferente respuesta de unos órganos respecto a otros, resulta consecuentemente importante para caracterizar el patrón de crecimiento en el periodo de edad estudiado. ¿En los animales de esta edad, alguno de los tres órganos estudiados se muestra más resistente a factores que retrasen o alteren su crecimiento?

Objetivo 2a: Queremos comprobar si hay una respuesta específica de cada uno de los

tres órganos a los estímulos que alteran su desarrollo o crecimiento. Conocer qué órgano es más resistente y cuál más sensible. Delimitar la intensidad de actividad glucocorticoide requerida para provocar efectos sobre un órgano dado y el margen de saturación de la respuesta de cada órgano.

Diseño experimental: Comparar las alteraciones de peso absoluto y relativo de cada órgano respecto a los otros dos en cada nivel de activación glucocorticoide.

Hipótesis 2b: Una alteración de peso en un órgano puede no ser considerada como una alteración en su crecimiento o desarrollo ya que puede deberse a diversos factores.

Objetivo 2b: Consiste en estudiar si los efectos sobre el peso de cerebro, corazón y riñón se corresponden realmente con una aplasia (menor número de células) de estos órganos, o con una atrofia (menor tamaño) de las células que integran el órgano en cuestión.

Diseño experimental: Utilizaremos el contenido total de ADN de cada órgano como una variable indicativa de la aplasia o hiperplasia del mismo. Existen modelos matemáticos comentados en la Metodología, que permiten un cálculo aproximado del número de células de un órgano en función del contenido total de ADN. También se puede calcular el índice del tamaño celular en el que interviene, además del contenido de ADN, el contenido de proteínas totales.

Para el cálculo de estos indicadores se valoran el contenido de ADN y de proteínas totales del encéfalo, corazón y riñón por técnicas bioquímicas apropiadas que se describen en la Metodología.

3. REFERENTE AL ESQUELETO

Entre los elementos o unidades que forman parte del total del animal, el esqueleto es un componente habitualmente olvidado desde el punto de vista fisiológico. Sin embargo, concurren en él varios factores a considerar: contribuye con el porcentaje más alto al

peso total del organismo junto con la musculatura, su desarrollo y dimensiones son causa directa de las dimensiones alcanzadas por el animal, y es un tejido vivo, sede de importantes intercambios metabólicos obviamente controlados hormonalmente, control en el que los glucocorticoides desempeñan una función.

Desde el punto de vista aplicado, el esqueleto resulta ser el resto orgánico *postmortem* más estable al paso de los años. De ello que ciencias como la Medicina Forense, la Antropología, la Paleontología y la Arqueología traten de "leer" en ellos la "historia biológica" de los individuos, poblaciones o especies que representan. Estos estudios resultan además bastante "rentables" para las ciencias mencionadas, ya que, al ser un tejido cuyo metabolismo se ajusta continuamente de acuerdo a las fluctuaciones del medio interno y del habitat, éstas dejan huellas indelebles en el esqueleto.

En este punto y como consecuencia de lo expuesto, podemos plantear aquellos objetivos de esta Tesis que consideramos más interesantes por ser los más novedosos, y los que realmente provocaron que nos planteásemos la realización de este trabajo.

HIPOTESIS 3: ¿Las alteraciones del crecimiento animal debidas a la actividad glucocorticoide y a los factores ambientales que la provocan, tales como el ruido, son detectables en el esqueleto?

OBJETIVO 3: Nos proponemos un estudio dimensional y constitutivo del esqueleto craneal de los animales sometidos a los diferentes tratamientos desde diferentes perspectivas que desglosaremos en las hipótesis 3a, 3b, 3c y 3d.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Nos gustaría, sobre todo, justificar aquí la elección del cráneo como componente del esqueleto a estudiar. Partiendo del hecho de la falta de experiencia de nuestro equipo de fisiólogos en este tipo de estudios, el cráneo nos resultó atractivo por ser una estructura relativamente voluminosa y compacta dentro del esqueleto global. Al estar formado por una diversidad de huesos distintos pero difícilmente disgregables y que representan zonas bien diferenciadas morfológica y funcionalmente (esplacnocráneo, neurocráneo, etc.), es capaz de generar una gran variedad de información en un análisis

conjunto.

Es, además, fácil de limpiar y manejar, está relacionando con uno de los órganos estudiados (encéfalo) que presenta una notable importancia funcional y orgánica. Contiene elementos, como son las piezas dentales, que aun no habiéndose estudiado ahora, pueden ser susceptibles de ser evaluados posteriormente. Esto último es de vital importancia considerando que la poca información bibliográfica respecto a alteraciones del esqueleto provocadas por estímulos ambientales o por agentes estresantes hace referencia frecuentemente a estudios sobre la dentición.

Por último, pensamos que el cráneo es la estructura ósea sujeta a cambios debidos al crecimiento durante mayor tiempo después de que el individuo alcanza la pubertad, por lo que puede ser objeto de cambios morfológicos causados por estímulos ambientales en el periodo de edad por nosotros estudiado. Sin embargo, su remodelación está menos sujeta a cambios generales de la actividad física locomotora, exploratoria o postural como sucede con los huesos de las extremidades.

Hipótesis 3a: ¿Podría la actividad glucocorticoide, y estímulos ambientales como el ruido, reducir el tamaño del cráneo de los animales púberes?

Objetivo 3a: Nos proponemos comprobar las alteraciones de las dimensiones del cráneo provocadas por el exceso de glucocorticoides circulantes en función de su mayor o menor intensidad.

Diseño experimental: Se definen y se asigna nombre a 23 variables dimensionales del cráneo de la rata que aparecen descritas en el apartado correspondiente de la Metodología y que representan la totalidad del cráneo por zonas y dimensiones espaciales. Comparamos el valor que alcanzan estas variables en unos tratamientos respecto a otros.

Hipótesis 3b: Las variables craneométricas descritas pueden presentar distinta sensibilidad frente a los factores que alteren su crecimiento, de manera que unas dimensiones espaciales, o unas zonas del cráneo, se vean más afectadas que otras. ¿Podría verse alterada la

morfología craneal?. ¿Qué zonas del cráneo son más estables y cuál es la intensidad de la activación glucocorticoide que las modifica, así como su margen de tolerancia a la modificación?.

Objetivo 3b: Pretendemos comprobar posibles cambios morfológicos en relación con la distinta intensidad de actividad glucocorticoide, de acuerdo con la alteración diferencial de variables craneométricas que representan diferentes dimensiones espaciales del cráneo, o diferentes zonas del esplacno o neurocráneo.

Diseño experimental: En este caso se estudian y comparan entre los diferentes tratamientos, 47 índices que relacionan las variables craneométricas entre sí, y que se describen en la Metodología. El estudio de los índices confirmará o no los resultados sobre efectos diferenciales planteados en el estudio individual de las variables.

Hipótesis 3c: De acuerdo con los resultados obtenidos en los anteriores objetivos cabe preguntarse ¿cuál es el patrón de crecimiento del cráneo a esta edad? y ¿qué variables son las más representativas del mismo a la hora de diseñar futuros estudios en animales de estas características (estirpe, edad, sexo)?.

Objetivo 3c: Consiste en caracterizar el patrón de crecimiento del cráneo en la estirpe, edad y sexo de los animales estudiados, señalando las variables más representativas que permitan asignar los animales al grupo experimental correcto de acuerdo con el efecto provocado sobre su crecimiento. Conseguir este objetivo es importante porque reducirá el número de variables a utilizar en futuros estudios aplicados a animales de las mismas condiciones, ya que el manejo de 23 variables y 47 índices resulta árduo y en ocasiones estéril.

Diseño experimental: Para ello, se hace un estudio de las variables craneométricas por técnicas de análisis estadístico multifactorial que permiten, por un lado, facilitar la interpretación de los resultados de un amplio número de variables sin que se produzca una pérdida considerable de información y, por otro, analizar la contribución de unas variables en relación a otras a la hora de clasificar, mediante funciones matemáticas, cada animal en su grupo experimental y respecto a los demás, de acuerdo con la magnitud o dimensión adquirida por la variable. Las técnicas referidas, que son descritas con detalle en la Metodología, son el

Análisis de Componentes Principales (ACP) y el Análisis Discriminante.

Hipótesis 3d: Los glucocorticoides, y otros mecanismos reguladores cuya alteración es concomitante con la activación del eje HHA, ejercen acciones diversas sobre el metabolismo intermediario. El metabolismo óseo y la actividad fundamental de las células óseas consiste en controlar los intercambios o el almacenamiento de distintos minerales (mayoritariamente calcio y fósforo). ¿Podría una actividad glucocorticoide intensificada alterar la composición mineral del hueso?. ¿Podría la alteración del contenido en un constituyente mineral específico representar el efecto de una actividad glucocorticoide intensa, o incluso relacionarse con la exposición a un factor ambiental específico como el ruido?. Ello puede ser de interés, pues validaría que una alteración específica en el contenido mineral, pueda ser considerada como un marcador indeleble de la exposición al estrés en los restos óseos de las poblaciones humanas o animales.

Objetivo 3d: Nos proponemos comprobar la existencia de alteraciones de los constituyentes del hueso, como consecuencia de la distinta intensidad de actividad glucocorticoide representada por los tratamientos. También pretendemos evaluar la existencia de algún constituyente, cuya alteración pueda ser considerada como marcador distintivo de la exposición al ruido.

Diseño experimental: Para ello se valora y cuantifica el contenido de ocho elementos minerales básicos, incluyendo calcio y fósforo, en las mandíbulas de los animales de los cinco grupos experimentales. La técnica utilizada que se describe en la Metodología, o ICP-AES, presenta una alta sensibilidad para la detección de componentes minerales en cantidades infinitesimales, en muestras geológicas y biológicas. Se compararán las cantidades de los ocho elementos, medidas por análisis estadísticos convencionales, para conseguir una aproximación a la existencia o no de alteraciones y, posteriormente, mediante análisis estadístico multifactorial se evaluará la contribución de la alteración de cada constituyente mineral a la caracterización del efecto de los tratamientos.

III. METODOLOGIA

III. METODOLOGIA

Con el objeto de facilitar la adquisición de los productos y medios instrumentales que se han empleado en las diferentes técnicas al servicio de nuestro diseño experimental, hemos confeccionado unas listas donde se muestran las características y las empresas que comercializan el material más específico utilizado. Estas listas aparecen recopiladas al final de este capítulo bajo los epígrafes de:

Anexo I. Reactivos específicos, hormonas y anticuerpos.

Anexo II. Aparatos.

1. MATERIAL BIOLOGICO

En el presente trabajo se han utilizado ratas macho de la estirpe Wistar, *Rattus norvegicus*, nacidas y criadas en el estabulario del Departamento de Biología Animal II (Fisiología) a partir de reproductores Iffa-Credo (Francia). Las condiciones de estabulación fueron controladas a 20-22°C de temperatura, fotoperiodo no invertido 12/12h luz/oscuridad y 64% de humedad.

Después del nacimiento, se seleccionaron los machos y se distribuyeron aleatoriamente en camadas de cinco crías cada una, empleándose jaulas de mantenimiento de 50x25x15 cm (Panlab). A los veintidós días de edad, los animales fueron destetados y se formaron grupos homogéneos en peso, de cinco animales por jaula. A partir de ese momento, fueron mantenidos con agua y comida "ad libitum"; se utilizó una dieta especial para rata, tipo A0.4 de Panlab, con un contenido energético de 299 Kcal/Kg. Con la finalidad de comprobar la homogeneidad en el peso de los diferentes grupos, todos los animales se pesaron al nacimiento, destete y sesenta días de edad.

Todos los tratamientos se iniciaron cuando los animales cumplieron sesenta días de edad.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. TRATAMIENTOS

Cada tratamiento tuvo una duración de treinta días (desde el día sesenta al noventa de vida), efectuándose entre las 8:30 y 9:30 h.

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- a.- Estímulo sonoro (**Grupo Str**). Se aplicó una señal acústica continua de 2640 Hz, con una potencia de 30 W y una intensidad de 102 dB, durante 15 min/día. Dicho tratamiento se realizó entre las 9:15 y 9:30 h.
- b.- Administración de ACTH (**Grupo Ac**). Se administró diariamente una inyección subcutánea (sc) de ACTH, en dosis de 1.5 UI/100 g de peso corporal.
- c.- Administración de dexametasona (**Grupo Dx**). Se inyectó diariamente una dosis de 100 µg/100 g de peso corporal, vía sc.
- d.- Administración de dexametasona y aplicación del estímulo sonoro (**Grupo DxStr**). Se aplicaron diariamente los tratamientos -c- y -a-, en este orden, con un intervalo de 30 min.
- e.- Animales control (**Grupo Co**). Estos animales fueron manipulados (transporte, pesaje, salino) de igual forma que los tratados, exceptuando los estímulos estresantes y las administraciones hormonales.

La señal sonora utilizada como estímulo estresante se obtuvo mediante un ordenador personal y un ecualizador, con los que se determinó la frecuencia, la duración y

el tipo de señal. Dicho sonido se grabó en una cinta magnetofónica.

2.2. PROCEDIMIENTO

Entre las 8:35 y 8:45 h se inyectaba a los animales de los grupos Ac, Dx y DxStr. A continuación, se dejaban 30 min de reposo y a las 9:15 h todos los animales eran transportados hasta las salas de estrés; en éstas se sometían al estímulo solamente los grupos Str y DxStr. A las 9:30 h todos los grupos eran devueltos al animalario, concluyendo así el tratamiento.

Los animales se trataron diariamente y fueron sacrificados el último día del citado periodo (30 días), no antes de una hora de finalizada la última sesión o administración. Se utilizaron 10 animales por grupo.

Las cantidades de hormona a inyectar en cada caso se calcularon a partir de los pesos individuales, de forma que se modificó cuando fue necesario, para mantener la dosis. La dilución de las mismas se realizó de manera que el volumen inyectado fuese de 0.25 ml por cada 100 g de peso corporal.

2.3. PARAMETROS A ESTUDIAR

Se valoraron los efectos de los distintos tratamientos sobre los siguientes parámetros:

- **Parámetros hormonales:**
 - Se midieron los *niveles plasmáticos de corticosterona* mediante la técnica de radioinmunoanálisis, cuyo desarrollo se describe en el apartado de técnicas analíticas.
- **Parámetros de crecimiento y desarrollo:**
 - *Evolución temporal de la ganancia de peso* durante el tratamiento, evaluada a través de la construcción de curvas de peso de los animales. Estas curvas se

obtuvieron a partir de las medidas de este parámetro realizadas cada tres días.

- *Evolución de la ingesta de comida.* Su evaluación se efectuó mediante el control de la ingesta de comida con igual periodicidad que para la ganancia de peso.
- *Distribución de grasa subcutánea* en los pliegues escapular, central del lomo y dorsal de la pata trasera. Se valoró mediante el empleo del calibre de grasa.
- *Dimensiones corporales.* Estas dimensiones fueron la longitud total y la envergadura, determinadas por medición métrica.
- *Desarrollo y crecimiento del encéfalo, corazón y riñón.* Su evaluación se describe en el apartado denominado estudio del desarrollo de los órganos.
- **Craneometría.** La definición de las variables y de los índices craneométricos, y su obtención, se describen en el apartado correspondiente. La craneometría fue objeto de análisis estadístico convencional y multivariante, descrito en su correspondiente apartado.
- **Contenido de macro y microconstituyentes del hueso.** El contenido en el hueso de estos constituyentes minerales se determinó mediante la técnica de espectrometría de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES), cuyo procedimiento aparece en el apartado de técnicas analíticas. También fue objeto de un tratamiento estadístico especial.

3. OBTENCION DE MUESTRAS BIOLOGICAS DE LOS ANIMALES

3.1. MUESTRAS DE SANGRE Y PLASMA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, en una sala ajena al animalario y a la sala de exposición al estrés.

Las muestras de sangre se recogieron en vasos de precipitado con EDTA, en frío (4°C). Seguidamente, la sangre fue centrifugada a 4500 rpm durante 10 min a 4°C para la obtención del plasma.

Cada muestra de plasma se repartió en varias alícuotas que se conservaron a -20°C hasta el día de las correspondientes valoraciones hormonales.

3.2. MUESTRAS DE ORGANOS Y CRANEOS

Tras la decapitación de los animales se procedió a su necropsia para la obtención de los siguientes órganos.

Se extrajeron los riñones, corazón y encéfalo, siendo depositados en recipientes adecuados para su inmediato pesaje en fresco. Concluido éste, las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de las respectivas valoraciones.

En relación con el procesamiento de los cráneos de los animales tras la decapitación, las cabezas fueron desprovistas de la piel y congeladas hasta el inicio del estudio, momento en el cual fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este periodo de tiempo se cocieron durante 15 min en una solución de perborato de sosa (60 g/l) para, posteriormente, ser descarnadas con cuidado y así obtener los cráneos que fueron finalmente blanqueados con agua oxigenada.

Respecto al mantenimiento específico de las mandíbulas, éstas fueron envueltas en papel de parafina y mantenidas, hasta el momento del análisis, a -20°C con el fin de inhibir posibles reacciones de autólisis así como el desarrollo de microorganismos.

4. ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LOS ORGANOS

Con la finalidad de conocer si los efectos sobre el desarrollo de los órganos se corresponden con una aplasia o con una atrofia, se determinaron el número y

tamaño celular del encéfalo, corazón y riñón. Estas variables se determinaron aplicando las fórmulas descritas por **Enesco y Leblond (1962)**.

El número de células viene dado por el número de núcleos que se calcula considerando el contenido absoluto de ADN del órgano en relación con el contenido medio de una célula eucariota (6.2 pg).

$$\text{n}^{\circ} \text{ de núcleos} = \text{ADN (mg) del órgano} \times 10^3 / 6.2 \text{ pg}$$

Se considera como índice del tamaño celular a la relación entre el contenido en proteínas totales y el número de núcleos (en millones).

$$\text{Índice tamaño celular} = \text{Proteínas totales (}\mu\text{g)} / \text{n}^{\circ} \text{ núcleos (10}^6\text{)}$$

Para la realización de estos cálculos se precisa conocer el contenido total de ADN y proteínas de los órganos seleccionados, cuya valoración aparece descrita en los apartados 6.2. y 6.3., respectivamente.

5. TECNICA CRANEOMETRICA

Las medidas de cada una de las variables que a continuación se describen fueron tomadas con un calibre digital, de tal forma que se efectuaron para cada una de ellas tres estimas que posteriormente fueron promediadas con el fin de reducir el error intraobservador. La estimación fue siempre realizada por la misma persona.

Han sido medidas un total de 21 variables craneométricas. Estas variables forman parte de las habitualmente consideradas en los estudios craneométricos efectuados tanto en animales como en humanos (**Byrd, 1988; Nadal y cols., 1968**) y aparecen definidas en los tres ejes espaciales así como en las regiones dorsal y ventral del cráneo, siendo representativas tanto del esplacno como del neurocráneo. Los puntos anatómicos del cráneo que definen estas variables y su descripción aparecen respectivamente en la **Figura 4 a, b** y en la **Tabla 1**.

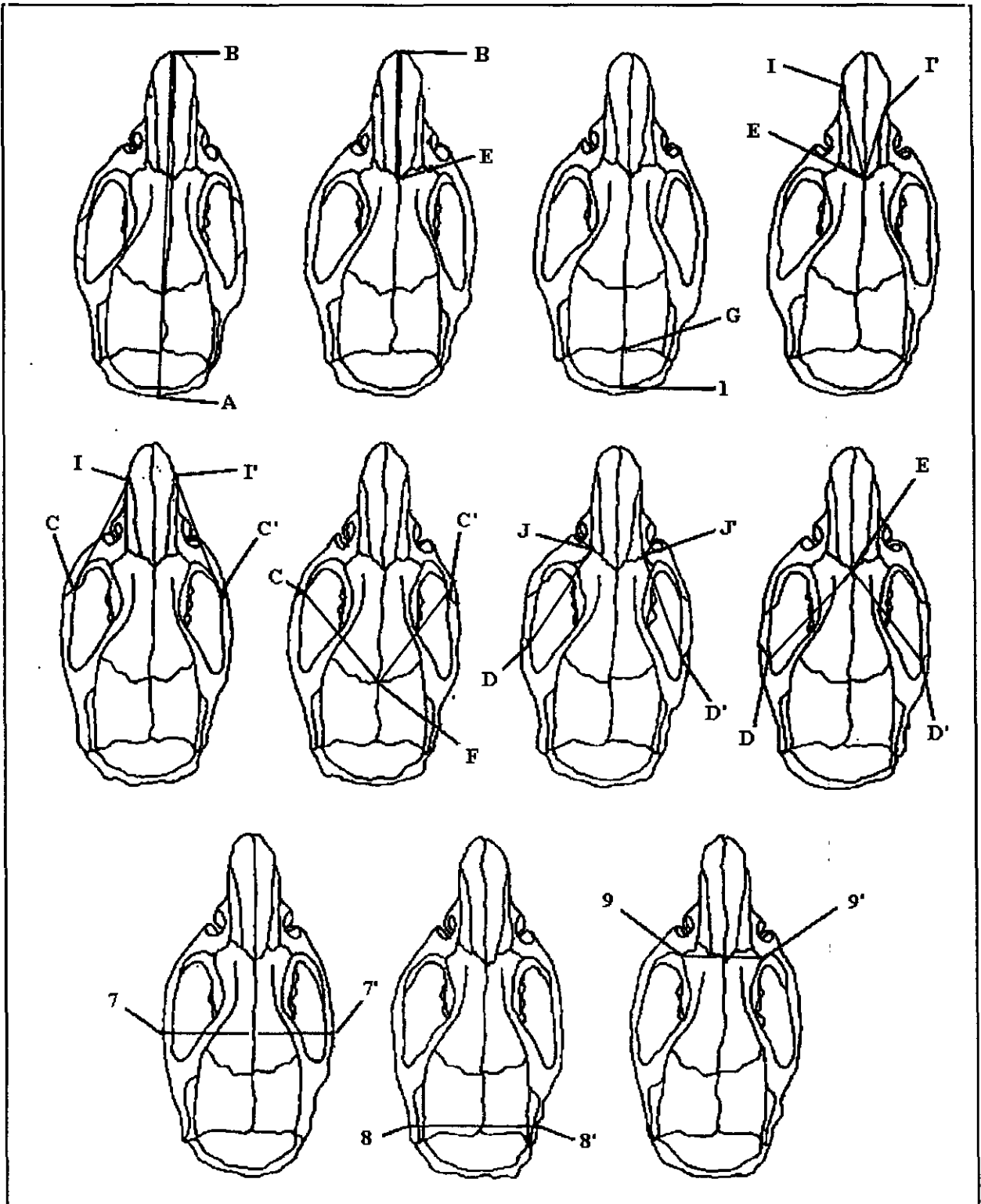


Figura 4 a: Variables craneométricas.

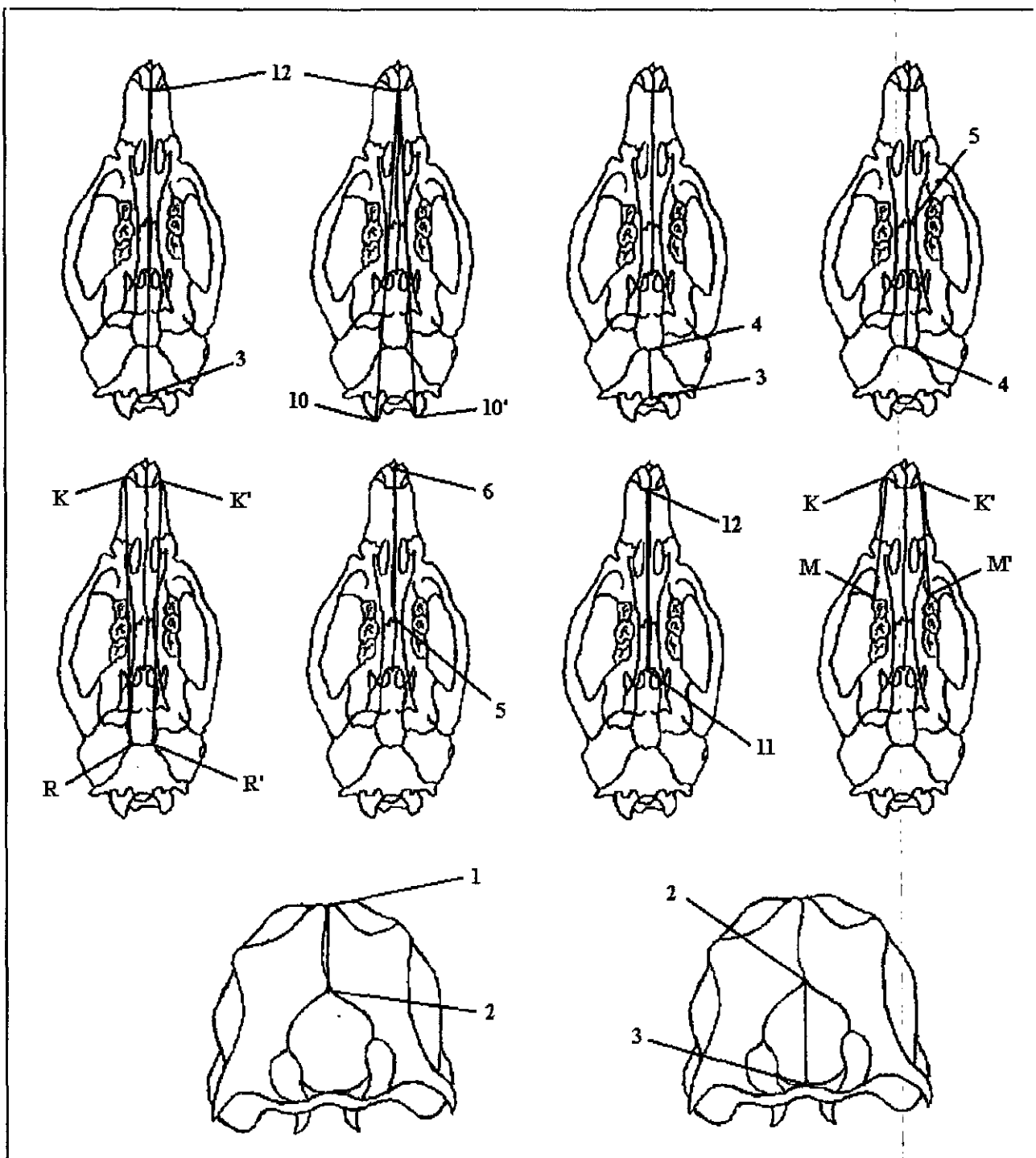


Figura 4 b: Variables craneométricas.

VARIABLES CRANEOMETRICAS	
A-B	longitud total o máxima del cráneo ; distancia comprendida entre el punto más saliente del hueso Occipital (A) y el punto más anterior de los huesos Nasales en la línea sagital (B).
B-E	longitud nasal ; distancia comprendida entre el punto más anterior de los huesos Nasales en la línea sagital (B) y el Nasion (E).
G-I	longitud supraoccipital ; distancia comprendida entre el Lambda (G) y el punto superior del hueso Occipital en la línea sagital (I).
E-I/E-I'	longitud intermaxilonasal máxima ; distancia comprendida entre el Nasion y el punto más anterior de la sutura Intermaxilonasal (I).
C-I/C'-I'	longitud cigointermaxilar ; distancia comprendida entre el punto superior de la sutura Maxilocigomática (C) y el más anterior de la sutura Intermaxilonasal (I).
C-F/C'-F'	longitud cigobregmática ; distancia comprendida entre el punto superior de la sutura Maxilocigomática (C) y el Bregma (F).
D-J/D'-J'	longitud yugo-frontomaxilointermaxilar máxima ; distancia comprendida entre el punto superior de la sutura Yugoescamosa (D) y el punto de unión frontomaxilointermaxilar (J).
D-E/D'-E	longitud yugonasal máxima ; distancia comprendida entre el Nasion (E) y el punto superior de la sutura Yugoescamosa (D).
7-7'	anchura bicigomática ; distancia comprendida entre los puntos de los arcos Cigomáticos más alejados de la línea sagital.
8-8'	anchura máxima del cráneo ; distancia comprendida entre los puntos del Neurocráneo más alejados de la línea sagital.
9-9'	anchura interorbitaria ; distancia comprendida entre los puntos del borde de las fosas Orbitarias más próximos a la línea sagital.
3-12	longitud basal ; distancia comprendida entre el Basion (3) y el Oral (12).
10-12	longitud cóndilo-basal ; distancia comprendida entre el Condilion (10) y el Oral (12).
3-4	longitud basioccipital ; distancia comprendida entre el Basion (3) y el punto medio de la sutura que separa el hueso Basiesfenoides del hueso Basioccipital (4).
4-5	longitud basisfenopalatina ; distancia comprendida entre el punto medio de la sutura que separa el hueso Basiesfenoides del hueso Basioccipital (4) y el punto medio de la sutura que separa el hueso Palatino del Proceso Palatino (5).
K-R/K'-R'	longitud bulo-intermaxilar ; distancia comprendida entre el punto más anterior del contacto incisointermaxilar (K) y el punto de contacto de la Bula timpánica, el hueso Basioccipital y el hueso Basiesfenoides (R).
5-6	longitud maxilar ; distancia comprendida entre el punto medio de la sutura que separa el hueso Palatino del Proceso Palatino (5) y el Prosthion (6).
11-12	longitud palatina ; distancia comprendida entre el Palation (11) y el Oral (12).
K-M/K'-M'	longitud del arco dental mínimo ; distancia comprendida entre el punto más anterior del contacto incisointermaxilar (K) y el punto anterior del primer molar (M).
1-2	altura exooccipital ; distancia comprendida entre el punto superior del hueso Occipital en la línea sagital (1) y el Opisthion (2).
2-3	altura del Foramen magnum ; distancia comprendida entre el Opisthion (2) y el Basion (3).

Tabla 1: Descripción de las variables craneométricas.

Asimismo se establecieron 47 índices a partir de las variables craneométricas descritas (Tabla 2). En ellos, cuando la variable denominador representa una anchura, la abreviatura del índice comienza por T y cuando representa una longitud, lo hace por L, salvo cuando esa longitud es la total, en cuyo caso el índice comienza por I.

Previamente a la descripción de los índices considerados, es necesario definir dos nuevas variables craneométricas dada su implicación en varios de ellos. Estas variables, que no fueron estimadas directamente, son:

neuro	longitud del neurocráneo ; distancia comprendida entre el punto más saliente del hueso Occipital (A) y el Nasion (E). Su valor procede de la diferencia numérica entre los valores de las variables A-B y B-E.
5-12	longitud prepalatina ; distancia comprendida entre el punto medio de la sutura que separa el hueso Palatino del Proceso Palatino (5) y el Oral (12). Su valor procede de restar al valor de la variable 3-12 los correspondientes a las variables 3-4 y 4-5.

INDICES CRANEOMETRICOS	
Ind. basioccipital longitudinal	$L\text{-basiocc} = 100 * 3-4 / \text{neuro}$
Ind. bicigomático longitudinal	$L\text{-bicigom} = 100 * 7-7' / \text{neuro}$
Ind. cefálico longitudinal	$L\text{-cefalic} = 100 * 8-8' / \text{neuro}$
Ind. cigobasal longitudinal	$L\text{-cigobas} = 100 * 7-7' / 3-12$
Ind. cigobregmático longitudinal	$L\text{-cigobre} = 100 * C-F / \text{neuro}$
Ind. cigointermaxilar longitudinal	$L\text{-cigoint} = 100 * C-I / \text{neuro}$
Ind. diastema longitudinal	$L\text{-diastem} = 100 * K-M / 11-12$
Ind. esfenopalatino longitudinal	$L\text{-esfenop} = 100 * 4-5 / \text{neuro}$
Ind. exooccipital longitudinal	$L\text{-exoccip} = 100 * 1-2 / \text{neuro}$
Ind. longitudinal del foramen	$L\text{-foramen} = 100 * 2-3 / \text{neuro}$
Ind. interorbitario longitudinal	$L\text{-interor} = 100 * 9-9' / \text{neuro}$
Ind. maxilar longitudinal	$L\text{-maxilar} = 100 * 5-6 / 3-12$
Ind. nasal longitudinal	$L\text{-nasal} = 100 * B-E / \text{neuro}$
Ind. nasointermaxilar longitudinal	$L\text{-nasoint} = 100 * E-I / \text{neuro}$
Ind. palatino longitudinal	$L\text{-palatin} = 100 * 11-12 / 3-12$

Tabla 2: Descripción de los índices craneométricos.

INDICES CRANEOMETRICOS	
Ind. prepalatino longitudinal	$L\text{-prepala} = 100 * 5\text{-}12 / 3\text{-}12$
Ind. supraoccipital longitudinal	$L\text{-supraoc} = 100 * G\text{-}1 / \text{neuro}$
Ind. yugointermaxilar longitudinal	$L\text{-yugoint} = 100 * D\text{-}J / \text{neuro}$
Ind. yugonasal longitudinal	$L\text{-yugonas} = 100 * D\text{-}E / \text{neuro}$
Ind. basioccipital transversal	$T\text{-basiocc} = 100 * 3\text{-}4 / 8\text{-}8'$
Ind. cigobregmático transversal	$T\text{-cigobre} = 100 * C\text{-}F / 8\text{-}8'$
Ind. craneofacial transversal	$T\text{-craneof} = 100 * 7\text{-}7' / 8\text{-}8'$
Ind. diastema transversal	$T\text{-diastem} = 100 * K\text{-}M / 7\text{-}7'$
Ind. exoccipital transversal	$T\text{-exoccip} = 100 * 1\text{-}2 / 8\text{-}8'$
Ind. transversal del foramen	$T\text{-foramen} = 100 * 2\text{-}3 / 8\text{-}8'$
Ind. interorbitario transversal	$T\text{-interor} = 100 * 9\text{-}9' / 8\text{-}8'$
Ind. maxilar transversal	$T\text{-maxilar} = 100 * 5\text{-}6 / 7\text{-}7'$
Ind. nasointermaxilar total	$I\text{-nasoint} = 100 * E\text{-}I / A\text{-}B$
Ind. supraoccipital total	$I\text{-supraoc} = 100 * G\text{-}1 / A\text{-}B$
Ind. longitudinal total	$I\text{-total} = 100 * \text{neuro} / A\text{-}B$
Ind. yugointermaxilar total	$I\text{-yugoint} = 100 * D\text{-}J / A\text{-}B$
Ind. yugonasal total	$I\text{-yugonas} = 100 * D\text{-}E / A\text{-}B$
Ind. basioccipital total	$I\text{-basiocc} = 100 * 3\text{-}4 / A\text{-}B$
Ind. bicigomático total	$I\text{-bicigom} = 100 * 7\text{-}7' / A\text{-}B$
Ind. cefálico total	$I\text{-cefalic} = 100 * 8\text{-}8' / A\text{-}B$
Ind. cigobregmático total	$I\text{-cigobre} = 100 * C\text{-}F / A\text{-}B$
Ind. cigointermaxilar total	$I\text{-cigoint} = 100 * C\text{-}I / A\text{-}B$
Ind. esfenopalatino total	$I\text{-esfenop} = 100 * 4\text{-}5 / A\text{-}B$
Ind. exoccipital total	$I\text{-exoccip} = 100 * 1\text{-}2 / A\text{-}B$
Ind. total del foramen	$I\text{-foramen} = 100 * 2\text{-}3 / A\text{-}B$
Ind. interorbitario total	$I\text{-interor} = 100 * 9\text{-}9' / A\text{-}B$
Ind. nasal total	$I\text{-nasal} = 100 * B\text{-}E / A\text{-}B$
Ind. nasointermaxilar total	$I\text{-nasoint} = 100 * E\text{-}I / A\text{-}B$
Ind. supraoccipital total	$I\text{-supraoc} = 100 * G\text{-}1 / A\text{-}B$
Ind. longitudinal total	$I\text{-total} = 100 * \text{neuro} / A\text{-}B$
Ind. yugointermaxilar total	$I\text{-yugoint} = 100 * D\text{-}J / A\text{-}B$
Ind. yugonasal total	$I\text{-yugonas} = 100 * D\text{-}E / A\text{-}B$

Tabla 2 (continuación): Descripción de los índices craneométricos

6. TECNICAS ANALITICAS

6.1. VALORACION DE CORTICOSTERONA PLASMATICA

Se utilizó la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) puesta a punto por **Villanúa y Gamallo (1985)**. Al ser la corticosterona una hormona esteroide se hace necesaria, a partir de cada muestra, una fase previa de extracción de la hormona. La corticosterona marcada es de uso comercial. Esta técnica consta, por consiguiente, de tres partes:

- Proceso de extracción de la corticosterona con diclorometano. Finalizada la cual se realiza en el extracto una estima de la recuperación de corticosterona.
- Reacción antígeno-anticuerpo.
- Separación con hidroxapatita de las fracciones ligada y libre mediante varias centrifugaciones seguidas de lavados con tampón fosfato.
- Contaje y cuantificación.

6.1.1. REACTIVOS ESPECIFICOS

- Tampón fosfato 0.05 M, pH 7.4. Para 1 l, en agua destilada:
 - 6.175 g de fosfato disódico.
 - 0.818 g de fosfato monosódico.
 - 0.876 g de cloruro sódico.
- Solución tampón TF-AG 0.005 M, pH 7.4.
 - Se diluye tampón fosfato 0.05 M en agua destilada en la proporción 1/10 (v/v).

Por cada 100 ml de esta solución se añaden:

60 ml de BSA.

20 mg de gamma globulina.

- Tampón fosfato 0.001 M, pH 7.4.
Se diluye tampón fosfato 0.05 M en agua destilada en la proporción 1/50 (v/v).
- Suspensión de hidroxiapatita, al 2.5% (p/v) en tampón fosfato 0.001 M.
- Solución de Aquasol (Dupont). Esta solución se utiliza para la medida de muestras acuosas, tanto en los propios tubos de RIA como en los viales de centelleo.
- Solución madre de corticosterona fría de 1 µg/ml de etanol.
- Solución de corticosterona marcada, con una actividad de 6800 dpm por 100 µl de TF-AG.
- Solución de anticuerpo, a una dilución 1:10000

6.1.2. EXTRACCION DE CORTICOSTERONA

Se descongelan las muestras de plasma y se agitan en vortex. En tubos de extracción, con boca esmerilada y tapón de vidrio, se preparan los problemas y los blanco de acuerdo con el siguiente protocolo:

	PROBLEMA	BLANCO
Muestra de plasma	50 µl	-
Agua destilada	450 µl	500 µl
Corticosterona-H ₃	50 µl	50 µl
AGITAR Y REPOSAR 20 MINUTOS		
Diclorometano	5 ml	5 ml

La adición de la corticosterona-H3 se realiza para controlar las pérdidas durante el proceso, lo que se valora al final como estima de la recuperación de corticosterona.

A continuación todos los tubos se colocan en el agitador rotatorio a 30 rpm durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se aspira el sobrenadante (fase acuosa) con una bomba de vacío. El residuo se decanta a tubos de vidrio limpios y se evapora a sequedad bajo corriente de aire o mediante vacío, en baño a 37°C.

A los extractos secos (uno por muestra) se les añade 1 ml de tampón TF-AG 0.005 M pH 7.4. Se agitan 1 minuto y se dejan reposar durante 30 min. De cada extracto redissuelto se apartan 100 µl en un tubo para la realización del RIA propiamente dicho.

Antes de continuar con el proceso del RIA, vamos a realizar la estimación de la **recuperación de corticosterona** tras el proceso de extracción. Para ello se pipetea en viales para conteo (un vial por muestra) 500 µl del correspondiente extracto redissuelto y en otros tres viales, para determinar la actividad total, 50 µl de corticosterona-H3. Se les añade 10 ml de solución de conteo Aquasol y se cuentan durante 10 minutos en un espectrómetro β de centelleo líquido. Los resultados de recuperación de la extracción aparecen registrados en el apartado de características del RIA.

6.1.3. REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

Se parte de la solución madre de corticosterona fría para construir una curva patrón de corticosterona con nueve puntos que comprenden un rango de concentraciones de 3 a 8000 pg/tubo en 2 ml de TF-AG.

A continuación se procede a la valoración por duplicado de las muestras y por triplicado de los puntos de la curva patrón, de acuerdo con el siguiente protocolo:

	PROBLEMA	PATRON
Extracto problema	100 µl	-
Patrón correspondiente	-	100 µl
Anticuerpo	500 µl	500 µl
AGITAR Y PREINCUBAR 30 MINUTOS		
Corticosterona-H3	100 µl	100 µl

A los tubos de las muestras y de la curva patrón hay que añadir:

- Tres tubos de actividad total (At), conteniendo unicamente 100 µl de corticosterona-H3.
- Tres tubos residuales (N), conteniendo 600 µl de tampón y 100 µl de corticosterona-H3.
- Tres tubos cero (B0), que no llevan patrón ni problema, para dar el punto cero de la curva. Cada uno de ellos contiene 100 µl de corticosterona-H3, 500 µl de anticuerpo y 100 µl de tampón.
- Además se incluye, entre los tubos de un grupo experimental y el siguiente, la valoración de un suero comercial estándar de corticosterona que permite la estimación de variaciones intra e interensayo, resultados que aparecen en el apartado de características del RIA.

Tras agitar todos los tubos se incuban a 2-4°C durante 12 a 18 h en reposo.

6.1.4. SEPARACION DE LAS FRACCIONES LIGADA Y LIBRE

Se añaden 200 µl de la suspensión de hidroxipatita a todos los tubos menos a los At, y a continuación se realizan las siguientes operaciones:

- Se agita y se centrifuga a 1500 g durante 10 min. Se conserva el precipitado.

- Se añade 1 ml de tampón fosfato 0.001 M pH 7.4.
- Se agita y se centrifuga a 2000 g durante 10 min. Se conserva el precipitado.
- Se añade 50 µl de tampón fosfato 0.05 M pH 7.4 para resuspender el precipitado.

Se agitan todos los tubos y se añade a cada uno 2 ml de solución de Aquasol. A continuación se introducen en viales de vidrio y se mide la radioactividad en un espectrómetro de centelleo β durante 4 min.

6.1.5. CARACTERISTICAS DEL RIA

La **recuperación de la corticosterona-H3** añadida a las muestras de plasma después del proceso de extracción fue de 78 ± 8.6 ng/ml. La **sensibilidad de la curva patrón** fue de 0.08 ng/ml. Los **coeficientes de precisión intra e interensayo** fueron del 8% y 11.7%, respectivamente.

6.2. VALORACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Se siguió la técnica descrita por **Schneider (1957)** basada en la solubilidad de los ácidos nucleicos en ácido tricloroacético caliente. Consta de dos partes: la extracción en frío de los compuestos solubles en ácido y alcohol, y la determinación y cuantificación mediante colorimetría de los ácidos nucleicos.

6.2.1. REACTIVOS ESPECIFICOS

- Suero salino: cloruro sódico 0.12 M.
- Reactivo de difenilamina:

- 1 g de difenilamina purificada.
- 100 ml de ácido acético glacial.
- 2.75 ml de ácido sulfúrico concentrado.

6.2.2. EXTRACCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Se procede a la homogeneización de los órganos. El encéfalo se homogeneiza entero con 3.4 ml de suero salino y 6.6 ml de etanol al 96%. En el caso del corazón y los riñones, se toma una alícuota de aproximadamente 0.4 g y se homogeneiza con 2 ml de suero salino y 4 ml de etanol al 96%. A continuación se toma 1 ml de homogeneizado y se procede a sucesivas extracciones en frío (4°C) y por duplicado:

- Primero con ácido tricloroacético 0.15 N (2.5 ml) y separación del precipitado por centrifugación (4500 rpm, 10 min).
- Después con etanol al 96% (5 ml) y separación del precipitado por centrifugación (4500 rpm, 10 min).

Posteriormente, para separar las proteínas se realizan dos sucesivas incubaciones del precipitado con ácido tricloroacético 0.075 N, en baño a 75°C (2.6 ml, 30 min y 0.5 ml, 15 min). En ambos procesos se separa el sobrenadante, en el que se encuentran los ácidos nucleicos, mediante centrifugación (4500 rpm, 10 min).

6.2.3. VALORACION DE ADN

De acuerdo con **Schneider (1957)**, la difenilamina al ser calentada en solución ácida reacciona con la desoxirribosa produciendo una tonalidad azul.

A partir de una solución madre de ADN de timo de ternera disuelto en agua destilada, se construyeron los patrones de la curva estándar en un rango de concentraciones de 5 a 500 µg/ml. La ecuación resultante fue la siguiente:

Concentración de ADN = absorbancia x 528.459 + 0.149

coeficiente de correlación $r = 0.999640594$

A continuación se procede a valorar los patrones y las muestras por duplicado conforme con el siguiente protocolo:

A 2 ml de muestra se añaden 4 ml de reactivo de difenilamina y se incuba durante 10 min al baño María. Se enfría en baño a temperatura ambiente durante 5 min. El blanco se preparó con ácido tricloroacético 0.075 N. La lectura de absorbancia se realizó a 600 nm.

6.3. VALORACION DE PROTEINAS TOTALES

Las proteínas se determinaron siguiendo la técnica colorimétrica descrita por **Lowry y cols. (1951)**. Consiste en la formación de compuestos hemiquinónicos coloreados (tonalidad azul) por la acción del ácido fosfomolibdotúngstico sobre el grupo fenólico de los residuos de tirosina presentes en las cadenas polipeptídicas. Previamente las proteínas se desnaturalizan de forma que todos los restos de tirosina queden expuestos al medio acuoso. Esto se consigue utilizando sales de Cu^{2+} en medio básico (pH 10), formándose complejos estables entre dicho catión y los grupos $-\text{NH}-$ del enlace peptídico.

6.3.1. REACTIVOS ESPECIFICOS

- Reactivo A: carbonato sódico 0.19 M en hidróxido sódico 0.1 N.
- Reactivo B: se mezclan en proporción 1:1 (v/v) las siguientes soluciones: sulfato de cobre II 0.04 M y tartrato sódico potásico 0.07 M.
- Reactivo C: 50 ml de reactivo A + 1 ml de reactivo B.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu: diluido con agua destilada en proporción 1:2 (v/v).

6.3.2. DETERMINACION DE PROTEINAS

Para realizar la curva patrón se utilizó albúmina bovina, fracción V, disuelta en suero salino en un rango de concentraciones de 5 a 300 µg/ml. La ecuación resultante fue la siguiente:

$$\text{Concentración de Proteínas} = \text{absorbancia} \times 1016.295 - 24.337$$

$$\text{coeficiente de correlación } r = 0.995069248$$

Las proteínas se valoraron partiendo del homogeneizado realizado para la extracción de los ácidos nucleicos. Cada muestra se diluyó 200, 60 y 55 veces dependiendo de la cantidad de proteína esperada. Se procedió según el protocolo descrito por **Lowry y cols. (1951)**.

El blanco se preparó con 0.8 ml de una solución de suero salino. La lectura de absorbancia se realizó a 500 nm.

6.4. VALORACION DE LOS CONSTITUYENTES MINERALES DEL HUESO

Esta valoración se realizó empleando la técnica denominada espectrometría de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES), metodología desarrollada para el análisis de hueso por **Martín en 1993**.

Esta técnica se basa en la propiedad que tienen los átomos, en su estado fundamental, de absorber ciertas cantidades de energía pasando a estados excitados. En su vuelta al estado de equilibrio, el átomo o ión excitado devuelve la energía absorbida en forma de radiaciones electromagnéticas emitidas en longitudes de onda características, de tal modo

que esa energía cedida es única para cada elemento y constituye su espectro atómico.

6.4.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Esta técnica analítica requiere una preparación previa de las mandíbulas a analizar dado que la forma más generalizada para la introducción de la muestra en un plasma es en solución. Esta preparación consiste en las siguientes etapas:

- Secado: las mandíbulas son desecadas a 110°C en una estufa durante un periodo de 24 h.
- Calcinación: cada pieza ósea se divide en dos partes y se pesa para a continuación introducirse en un horno de mufla previamente calentado a 100°C . Se establece una rampa de temperaturas hasta alcanzar $400 \pm 40^{\circ}\text{C}$ en 35 min. Las muestras se mantienen a dicha temperatura durante 4 h. Transcurrido ese periodo de tiempo se dejan enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente.
- Disolución: se pesan 0.25 g de muestra calcinada, la cual se introduce en un horno de digestión por microondas y se añaden 2 ml de HCl 2 N y 1 ml de HNO_3 . Se agita levemente. La muestra disuelta se eluye hasta un volumen final de 50 ml.

6.4.2. DETERMINACION DE MACRO Y MICROCONSTITUYENTES

Se realizan barridos espectrales en el entorno de la línea de emisión de cada constituyente mineral, de entre 0.05 nm a 0.1 nm, registrándose los espectros gráficos del mismo así como del blanco y el de las soluciones interferentes. Con la visualización de dichos espectros se evalúan los efectos de solapamientos total y parcial de las señales de emisión, así como las inherentes a las impurezas de los reactivos.

Comparando el espectro total de la muestra con los espectros individuales de cada elemento, se identifican cualitativamente los elementos presentes en la muestra. Para conocer la cantidad de cada elemento, se mide la intensidad de luz producida a la longitud de onda característica de cada elemento y se compara con la emitida por él a una concentración conocida.

6.4.2.1. PATRONES PARA LA DETERMINACION DE MACROCONSTITUYENTES

Debido a las altas concentraciones de calcio y fósforo, principales constituyentes de la muestra ósea, su análisis es más idóneo en muestra diluida. La dilución óptima para todas las muestras es la 1:20. Se elaboran cuatro patrones y el blanco de reactivos.

A las soluciones patrón se les añadieron los siguientes componentes:

- Todos los macroconstituyentes que están presentes en la muestra en las concentraciones que aparecen en el siguiente esquema:

($\mu\text{g/ml}$)	BLANCO	P-1	P-2	P-3	P-4
Ca		20.0	50.0	76.4	100.0
P		10.0	20.0	30.0	50.0
La	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

- Los reactivos de ataque del material a analizar, diluidos en la misma proporción que estos se encuentran en la muestra.
- 50 $\mu\text{g/ml}$ de lantano como patrón interno.

6.4.2.2. PATRONES PARA LA DETERMINACION DE MICROCONSTITUYENTES

Para la curva de calibrado se preparan cuatro patrones y el blanco de reactivos, a los que se añade:

- Los reactivos de ataque (HCl 0.5% v/v y HNO₃ 0.5% v/v).
- Los elementos macroconstituyentes en la misma proporción que estos se presentan en solución, tal como recoge el esquema siguiente:

(µg/ml)	BLANCO	P-1	P-2	P-3	P-4
Ca	1800	1800	1800	1800	1800
P	900	900	900	900	900
Mg		20	50	80	100
Zn		0.50	1.00	2.00	5.00
Cu		0.02	0.04	0.10	0.40
Fe		0.10	0.25	0.50	1.00
Sr		0.10	0.25	0.50	1.00
Ba		0.02	0.04	0.10	0.40

6.4.2.3. CALCULO DE CONCENTRACIONES DE LAS SOLUCIONES INTERFERENTES

Este cálculo se realiza considerando una concentración global de muestra de 5000 µg/ml, que corresponde al ataque de 0.25 g de muestra calcinada aforada a un volumen final de 50 ml, estimando la concentración máxima previsible que dichos elementos pueden presentar en el material. Esta concentración fue de 1500 µg/ml para el calcio, 1000 µg/ml para el fósforo, 20 µg/ml para el magnesio y 1 µg/ml para el bario, hierro, estroncio, cobre y cinc.

7. ANALISIS ESTADISTICO

7.1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA

De los datos obtenidos para cada variable, se calcularon en cada grupo experimental los siguientes parámetros muestrales: media aritmética (m), desviación estándar (ds) y error estándar (e). En las Tablas se representa la media \pm desviación estándar y en las Figuras se representa la media \pm error estándar.

7.2. TEST ESTADISTICOS

7.2.1. ANALISIS UNIVARIANTE

- Análisis de varianza de una vía (ANOVA 1 vía): se utilizó para determinar las diferencias provocadas por los distintos tratamientos sobre las variables analizadas (Sokal y Rohlf, 1979).
- Análisis de varianza de dos vías (ANOVA 2 vías):
 - * Se aplicó a variables valoradas durante el periodo experimental y sometidas por tanto al efecto de dos factores, el tratamiento al que se exponían los animales y la variable temporal (Milton y Tsokos, 1987).
 - * Se utilizó para estudiar las diferencias ocasionadas por el lado del cráneo en el que fueron definidas aquellas variables craneométricas que son simétricas. El empleo de este test no condujo al encuentro de tales diferencias.
- Test de Fisher y test de Scheffe: se aplicaron "a posteriori" a variables que mostraban diferencias en el ANOVA con el fin de determinar la existencia de diferencias entre pares de grupos.

7.2.2. ANALISIS MULTIVARIANTE

- Análisis factorial: análisis de componentes principales (ACP). Se utilizó para determinar un número de factores o componentes que representasen a las variables de partida con una pérdida mínima de información.
- Análisis discriminante: nos permite encontrar funciones matemáticas con las que clasificar de forma inequívoca, en base a las variables evaluadas, cada individuo en uno de los grupos experimentales considerados.
- La significación estadística se consideró a partir de $p \leq 0.05$.

Todos los cálculos relativos a las variables consideradas se realizaron mediante el paquete Number Cruncher Statistical System, versión 5.05 (NCSS) (Hintze, 1987) y el paquete Statistical Package for the Social Sciences Plus, versión 3.0 (SPSS, 1989) en un ordenador AT INVES 640 A turbo II Monitor VGA.

ANEXO I. REACTIVOS ESPECIFICOS, HORMONAS Y ANTICUERPOS

- Acido desoxirribonucleico de timo de ternera tipo I (Sigma).
- Acido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal disódica (Sigma).
- Acido tricloroacético (TCA) (Merck).
- Albúmina sérica bovina (BSA) fracción V (Serva y Sigma).
- Antisero anticorticoesterona-21-hemisuccinato-BSA (Tecnovus Institute for Cancer Research, G.B.).
- Cloruro sódico (Panreac).
- Corticosterona (Lab. Martín).
- Corticosterona ($1\alpha,2\alpha$ -(N)-H), actividad específica 43 Ci/mmol (The Radiochemical Center, Amersham).
- Corticotropina (ACTH) (Nuvachten Depot) (Ciba-Geigy).
- Dexametasona (Fortecortin) (Merck).
- Diclorometano (Merck).
- Fosfato sódico y disódico (Merck).
- Gamma globulina sérica bovina, fracción II (Serva).
- Hidroxiapatita (Sigma).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck).

Los demás reactivos utilizados fueron de las casas Merck, Probus o Panreac, con un grado de pureza adecuado para análisis.

ANEXO II. APARATOS

- Agitadores magnéticos.
- Agitadores vortex.
- Balanzas de precisión (August Sauter K.G. Ebingen, sensibilidad 0.1 mg y H-64 de Mettler, sensibilidad 0.01 mg).
- Baño termostático.
- Calibre digital (Sylvac. Precisión 0.01 mm/0.001").
- Calibre de grasa (Holstain. Precisión 0.1 mm con una presión constante de 10g/mm).
- Centrífuga de sobremesa (Biofuge B-Heraeus).
- Centrífuga refrigerada (Hermle ZK-365 de Kontron).
- Centrífuga refrigerada de sobremesa (TJ-6 de Beckman).
- Colector automático (ISCO PYP).
- Congelador -20°C (Liebherr).
- Digestor por microondas (RMS-150 de Floyd).
- Ecualizador (Mecasaund Ex-4973 de Metz).
- Espectrómetro ICP-AES (JY-70 PLUS).
- Espectrofotómetro (Spectronic 1201 de Milton Roy).
- Espectrómetro de centelleo líquido β (LKB de Wallac).
- Espectrómetro de centelleo líquido α (Multi-prias 1 de United Technologies Packard).
- Estufa de desecación y esterilización.
- Fotómetro (UV-VIS DATA TEST ATOM 366).
- Homogeneizador (Potter-Elvehjen) acoplado a un rotor de 2900 rpm.
- Pipetas automáticas de puntas desechables (Eppendorf, Fixed finn, Gilson y Oxford).
- Reproductor de cintas magnetofónicas (CFS/71S de Sony).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ACTIVIDAD ADRENAL

La causa por la que este parámetro va a ser discutido en primer lugar reside en que su cuantificación resulta esencial por ser un indicador de la intensidad de la activación del eje HHA o de la acción glucocorticoide ejercida por nuestros tratamientos. El conocimiento de la intensidad representada por los mismos, desde este punto de vista, es la plataforma de partida para la interpretación del resto de los resultados.

Una de las consecuencias más directas e inmediatas de la estimulación adrenal por cualquier estímulo es la elevación de los niveles de corticosterona en sangre mientras que, contrariamente, la administración directa de hormonas glucocorticoides (dexametasona) inhibe la producción endógena de corticosterona adrenal en una medida indicativa del grado de acción ejercida por el glucocorticoide administrado. Por estos motivos, vamos a evaluar la actividad glucocorticoide representada por nuestros tratamientos midiendo dichos niveles.

Evidentemente nosotros ya hemos, en este sentido, caracterizado perfectamente nuestro modelo de estrés, fruto de nuestra ya larga trayectoria en este campo (Alario y cols., 1986; Alario y cols., 1987a,b; Gamallo y cols., 1988). Así, el estado trófico de las adrenales ha sido evaluado a través de un amplio número de variables (Alario y cols., 1987b) y junto con el grado de repercusión glucocorticoide de los tratamientos sobre el contenido hepático de glucógeno (Velasco, 1990; Alario, 1991) son, además del que nos concierne, otros parámetros que nos han permitido valorar con anterioridad la intensidad de nuestro modelo de estrés en términos de actividad adrenal y de acción glucocorticoide así como en relación a los otros modelos comparativos utilizados (administración de ACTH y dexametasona).

A pesar de ello, el punto de partida obligado de este trabajo debe ser la reproducción de esos datos previos en los animales especialmente tratados para la ocasión.

1.1. NIVELES DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

Los valores de corticosterona plasmática al finalizar el tratamiento se muestran en la Tabla 3 y se representan en la Figura 5.

CORTICOSTERONA (ng/ml)		
Grupo	m ± d.s.	Significación
Co	197 ± 39	bcde
Str	517 ± 54	acde
Ac	943 ± 55	abde
Dx	2 ± 0.5	abce
DxStr	42 ± 8	abcd
Grupo experimental F (4,45) = 1025.4 p ≤ 0.001		

Tabla 3: Niveles de corticosterona plasmática.

Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con estímulo sonoro produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de corticosterona ($p \leq 0.001$). La administración de ACTH produce a su vez un incremento de esta hormona ($p \leq 0.001$), que fue significativamente superior al del grupo Str ($p \leq 0.001$).

En relación con la administración de dexametasona, ésta causó una reducción significativa de los niveles de corticosterona en plasma ($p \leq 0.001$). El tratamiento conjunto de la dexametasona y del estrés tuvo por efecto una reducción de la corticosterona frente al grupo control ($p \leq 0.001$), aunque significativamente menos acentuada que la del grupo Dx ($p \leq 0.001$) como consecuencia de la acción estimulante del estrés.

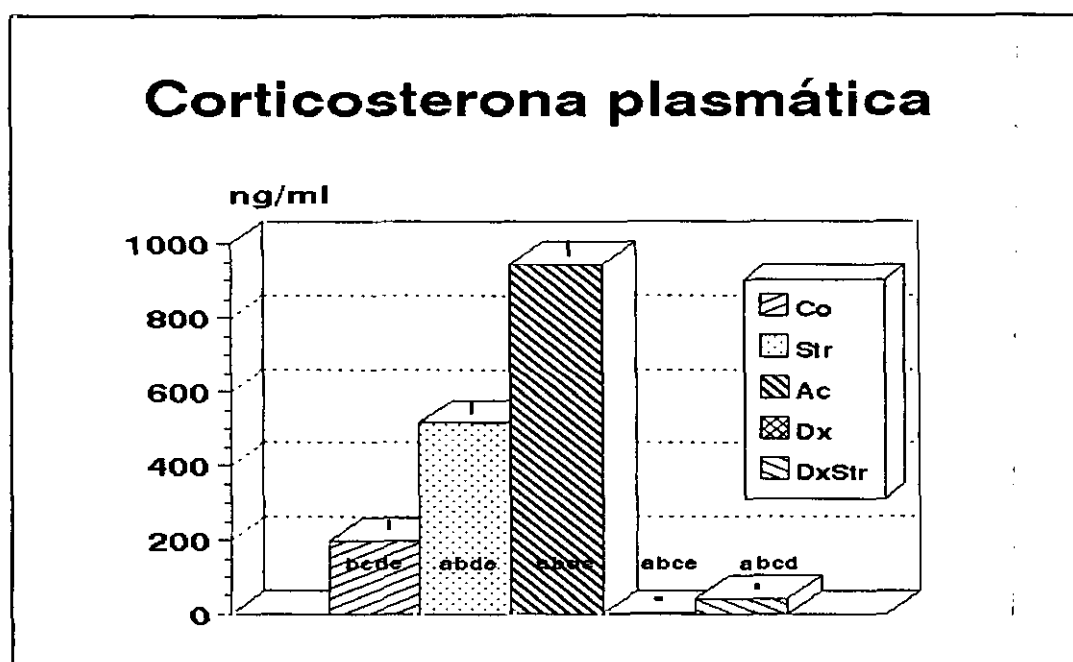


Figura 5: Niveles de corticosterona en plasma

Antes de iniciar el comentario de estos datos, y puesto que toda discusión se sustenta sobre resultados que son a su vez efecto de unos tratamientos determinados, pensamos que es importante, para poder discutir toda la información que nos brindan, conocer previamente qué objetivos determinaron en su momento el diseño experimental de nuestros tratamientos. Este diseño corresponde concretamente al objetivo 1 en el que desde el punto de vista de la actividad adrenal perseguíamos tres distintas intenciones con los tratamientos.

Por un lado que causaran unas elevadas concentraciones circulantes de glucocorticoides, endógenos o exógenos, con la finalidad de que reprodujeran parcialmente lo que sucede a nivel del eje HHA en los animales estresados. Además, pretendíamos que cada uno de los tratamientos representara un nivel diferente de estimulación de dicho eje de modo que los niveles anteriores quedasen excluidos y, por último, que se consiguiera entre unos y otros una graduación en la intensidad de la acción glucocorticoide para poder así establecer

correlaciones entre la acción de estas hormonas y la intensidad de los efectos que deseamos evaluar sobre el crecimiento. Obviamente la mayor o menor intensidad de la acción glucocorticoide sobre los tejidos es consecuencia de la intensidad de la estimulación corticoadrenal que se traduce, como ya hemos mencionado, en mayores o menores niveles circulantes del glucocorticoide endógeno (corticosterona), así como también es consecuencia de la dosis y naturaleza del glucocorticoide cuando en vez de estimular su producción endógena es administrado.

Atendiendo a estas tres intenciones los resultados muestran que, en efecto, la estimulación directa con ruido y la provocada con la administración de ACTH causan un aumento de la producción adrenal de corticosterona y en consecuencia aumentan los niveles en sangre de esta hormona. Estos resultados confirman los datos publicados anteriormente (**Gamallo y cols., 1988**). Nos preguntamos a continuación cómo se explican los bajos niveles circulantes de corticosterona encontrados en los animales tratados con dexametasona. La respuesta la hallamos en la dosificación y tipo de administración de la dexametasona empleada con lo que se consigue mantener en sangre concentraciones elevadas de este glucocorticoide exógeno y, consecuentemente, activar un mecanismo de regulación que inhibe la producción adrenal de corticosterona por una acción de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis. A esta razón hay que añadir la elección de la propia dexametasona que resulta ser un esteroide sintético con una elevada actividad glucocorticoide, superior a la del cortisol y a la de la propia corticosterona. Actividad que ha de manifestarse en sus acciones sobre los tejidos y que nosotros constatamos por su capacidad de inhibir la producción de sus homólogos endógenos. Estos resultados manifiestan el logro de la primera de nuestras pretensiones comentadas, pues como observamos todos los tratamientos causan elevadas concentraciones en sangre de glucocorticoides, ya sean estos endógenos o exógenos.

Por otra parte, en los tratamientos con estrés y ACTH se produce la activación del eje HHA, más intensa en el caso de la administración de ACTH, como manifiesta el aumento de los niveles circulantes de corticosterona encontrados pero, evidentemente, existe una diferencia esencial entre ambos tratamientos. Esta diferencia radica en el distinto nivel de activación hipotálamo-hipófiso-adrenal que conduce a dicho aumento siendo ésta, como mencionamos, otra de las intenciones perseguidas. De este modo, en los animales estresados, la activación del eje HHA afecta, una vez producida la integración sensorial del estímulo, a todos y cada uno de sus niveles: hipotálamo, hipófisis y glándulas

adrenales, mientras que en el caso de la administración de ACTH, dada su aplicación exógena, tiene lugar una inhibición de los niveles hipotalámico e hipofisario pero no de las adrenales cuya producción de corticosterona, como muestran los resultados, es por el contrario estimulada. Estos animales presentan pues altos niveles circulantes no sólo de corticosterona sino también de ACTH, a pesar de la inhibición hipofisaria, como resultado de su administración exógena. De igual forma el tratamiento con dexametasona inhibe los niveles hipotalámico e hipofisario pero, a diferencia del tratamiento con ACTH, se produce además una reducción de la producción de corticosterona. Consecuentemente estos animales presentan una actividad glucocorticoide elevada con una inhibición hipotálamo-hipófiso-adrenal importante y bajos niveles de ACTH circulante. De este modo, con la elección de nuestros tratamientos, pretendemos conocer qué efectos son debidos a la estimulación adrenal, y consecuentemente a las mayores concentraciones de glucocorticoides que constatamos cuando los animales son estresados, o si en los efectos participa además alguno de los intermediarios en la activación del eje.

En relación con la última de las pretensiones comentadas, la potente acción inhibidora de la dexametasona sobre el eje HHA está implícita en los bajos niveles de corticosterona circulante encontrados, ello conjuntamente con la dosis empleada se convierte en un indicador de su superior intensidad de acción glucocorticoide respecto a los restantes tratamientos. Dato que es apoyado además por los resultados hallados en trabajos previos relativos al efecto glucocorticoide sobre el contenido hepático de glucógeno en estos tratamientos (Velasco, 1990; Alario, 1991).

Los tratamientos con estrés y ACTH siguen en menor intensidad a los de dexametasona, reflejándose ahora sí en un aumento de los niveles circulantes del glucocorticoide endógeno. Además, los resultados muestran que la activación adrenal representada por nuestro tratamiento con ACTH es de mayor intensidad que la provocada por el estrés. Por su parte, el tratamiento conjunto de exposición al ruido y administración de dexametasona manifiesta la oposición de dos efectos ya mencionados: la activación del eje HHA por el estrés y su inhibición por la dexametasona (Alario y cols., 1987a), de ahí que las concentraciones de corticosterona no alcancen valores tan bajos como en el tratamiento único con dexametasona.

Como consecuencia, estos resultados relacionados con la actividad

adrenal satisfacen las premisas planteadas respecto al diseño y tratamientos experimentales, y contenidas en parte del Objetivo 1.

2. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS ANIMALES

De lo discutido hasta el momento queda claro que nuestros diferentes tratamientos experimentales representan una distinta intensidad de actividad glucocorticoide que, ciertamente, debe poseer una repercusión sistémica sobre diversos parámetros. Es de prever, además, que dicha repercusión refleje la graduación conseguida en la intensidad de la acción glucocorticoide a ellos asociada. Dado que esta Tesis tiene como interés primordial el estudio de las modificaciones de crecimiento y desarrollo vinculadas a situaciones de acción glucocorticoide elevada como lo es la exposición al estrés inespecífico, vamos a centrarnos de entre todos los factores sobre los que la actividad glucocorticoide podría estar incidiendo, en aquellos relativos al crecimiento de los animales lo cual supone atender a los distintos objetivos parciales en que hemos subdividido el citado Objetivo 1, de los cuales el Objetivo 1a se refería a las relaciones entre el peso corporal, las acciones lipolíticas de los glucocorticoides y la ingesta de comida.

2.1. GANANCIA DE PESO ACUMULADA Y EVOLUCION TEMPORAL DE LA GANANCIA DE PESO CORPORAL

Hemos medido la ganancia de peso de los animales desde el comienzo hasta el final del tratamiento (acumulada), así como su evolución temporal por periodos semanales, datos que se muestran en la Tabla 4 y se representan, respectivamente, en las Figuras 6 y 7.

Respecto a la ganancia de peso acumulada, tanto en el grupo Co como en los grupos experimentales Str y Ac los animales presentan una ganancia acumulada positiva. En el caso de los animales expuestos a estímulo sonoro no aparecen diferencias significativas frente a los controles. Por el contrario, en aquellos tratados con ACTH la ganancia de peso acumulada fue muy escasa y significativamente menor que la de los grupos Co y Str ($p \leq 0.001$). Los grupos Dx y DxStr muestran una pérdida de peso, no apareciendo

diferencias significativas entre ellos.

En relación con la evolución temporal de la ganancia de peso los grupos Co y Str muestran una ganancia de peso positiva durante todo el periodo de tratamiento. Por su parte, los grupos Dx y DxStr manifiestan una pérdida de peso durante todo el periodo experimental, más acentuada en la primera semana. El comportamiento de dicha variable no difiere entre ambos grupos. No ocurre así en el grupo Ac, que presenta en dicho comportamiento diferencias significativas frente a los restantes grupos ($p \leq 0.001$), de tal forma que la evolución de dicha variable se caracteriza por la alternancia de semanas en las que se produce una ganancia de peso con otras en las que se pierde peso. El balance final es una pendiente moderada en la evolución de esta variable.

GANANCIA DE PESO (g)						
Grupo	Signif.	Acumulada	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Co	cde	110.5 ± 20.5	34.7 ± 15.1	33.5 ± 6.9	24.1 ± 9.7	17.8 ± 9.2
Str	cde	109.3 ± 24.2	35.8 ± 13.2	27.7 ± 8.1	22.3 ± 5.5	23.5 ± 8.9
Ac	abde	5.2 ± 21.7	6.9 ± 14.6	-3.3 ± 10.7	4.8 ± 8.7	-4.0 ± 7.9
Dx	abc	-58.5 ± 23.9	-30.4 ± 14.8	-13.5 ± 9.0	-7.8 ± 8.4	-7.0 ± 7.2
DxStr	abc	-53.6 ± 19.8	-29.8 ± 13.6	-11.6 ± 7.0	-6.2 ± 7.5	-6.1 ± 6.1
Ganancia acumulada			Grupo experimental F (4,245) = 714.20 $p \leq 0.001$			
Evolución temporal (Anova 2 vías)			Grupo experimental F (4,980) = 862.48 $p \leq 0.001$			
			Semana de tratamiento F (3,980) = 7.89 $p \leq 0.001$			
			Interacción F (12,980) = 44.62 $p \leq 0.001$			

Tabla 4: Ganancia de peso acumulada y evolución de la ganancia de peso durante el tratamiento.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

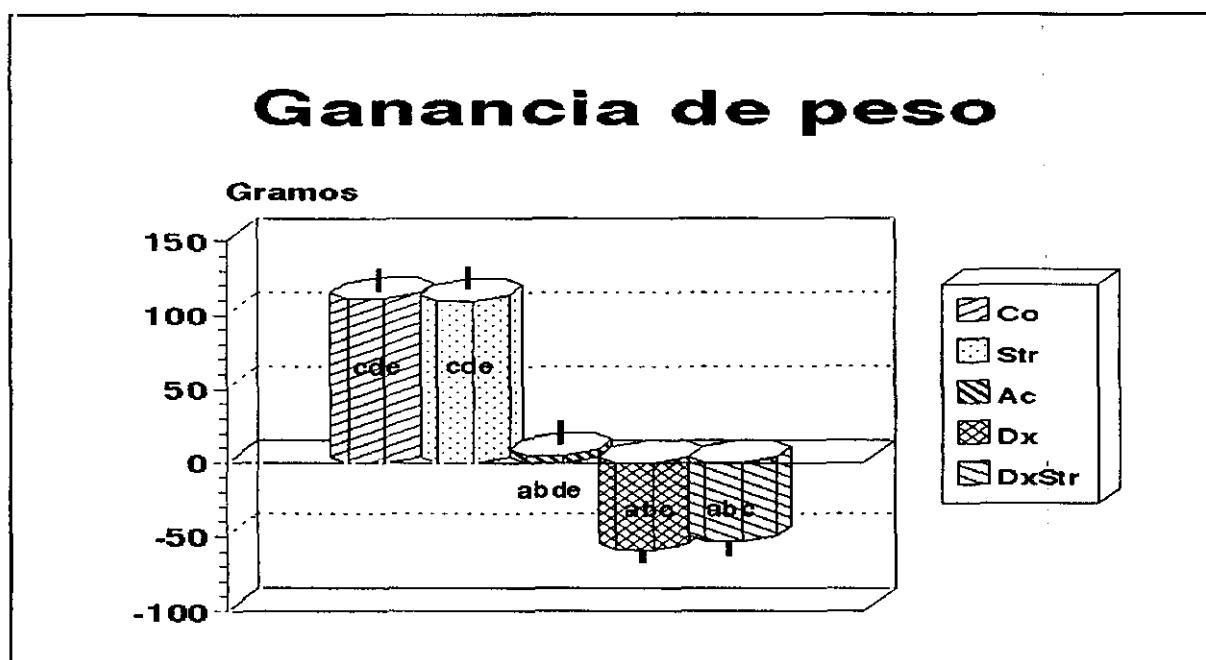


Figura 6: Ganancia de peso acumulada

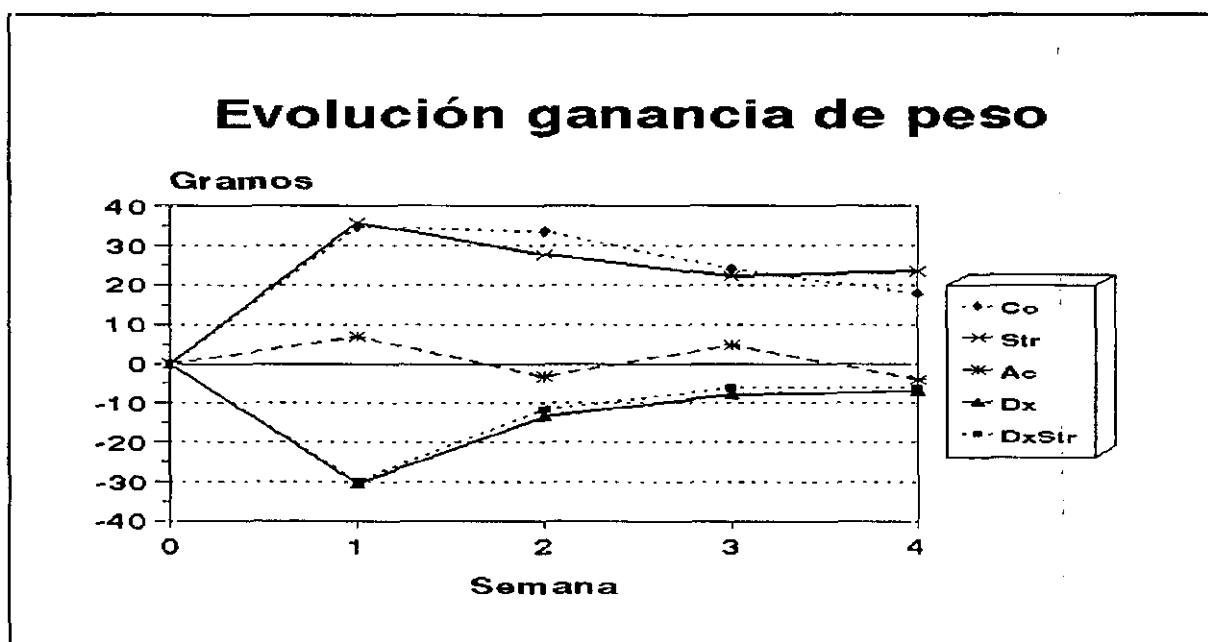


Figura 7: Evolución de la ganancia de peso durante el tratamiento

En primer lugar tenemos que señalar que de nuestros resultados (comportamiento del peso en los controles) se deduce que durante el periodo de vida analizado estos animales están aún en fase de ganar peso.

Además, como esperábamos, los resultados muestran una correlación entre la intensidad de la acción glucocorticoide asociada a los tratamientos y el grado de alteración de la ganancia de peso de los animales. Es interesante destacar, aunque no sorprendente, que la activación corticoadrenal generada por el estrés no logra modificar de forma significativa ni la ganancia de peso de los animales ni su evolución temporal, consecuencia del carácter moderado de este tratamiento.

Son numerosas las discrepancias en torno a la modificación o no de la ganancia de peso por efecto del estrés y así, frente a situaciones estresantes de diferentes tipos algunos autores describen una reducción de esta variable (**Mormède y cols, 1984; Pitman y cols., 1988**), mientras que otros no encuentran en ella alteraciones significativas (**Hsieh y cols., 1985; Restrepo y Armario, 1987**). De cualquier manera los niveles de corticosterona circulantes mediados por nuestro modelo de estimulación no parecen ser suficientes para provocar diferencias significativas en la ganancia de peso. Nuestros resultados podrían hacernos pensar que los niveles de corticosterona circulantes aumentados por la exposición a un estrés moderado no están afectando a los animales, lo cual dejaría sin contenido la continuación de este trabajo. Sin embargo, veremos más adelante que bajo un parámetro tan general como el peso corporal de un animal pueden subyacer efectos importantes que por moderados quedan enmascarados.

La situación opuesta la representan los tratamientos con dexametasona, en los que la intensidad de la acción glucocorticoide a ellos asociada es tal que la ganancia de peso no sólo disminuye sino que adquiere valores negativos. La pérdida de peso que muestran los animales así tratados, aunque es más notoria en la primera semana del tratamiento, se produce durante todo el periodo experimental, lo que incide en la superior intensidad de acción glucocorticoide de este tratamiento frente a los restantes. Esto se confirma cuando observamos que si bien el tratamiento con ACTH es capaz de provocar una pérdida de peso en la segunda y cuarta semanas no es suficiente para que el balance final sea efectivamente una pérdida de peso, sino que por el contrario, tal y como reflejan los datos, en estos animales se produce un ligero aumento de esta variable. En definitiva en los animales tratados con ACTH, cuyo grado

de acción glucocorticoide es intermedio respecto a los demás tratamientos, la natural ganancia de peso durante este periodo se estabiliza por la combinación de semanas en que la ganancia de peso es reducida con otras en las que se produce pérdida de peso.

Como ya es conocido, las acciones metabólicas de los glucocorticoides consisten en la movilización de glucosa hacia el hígado y su almacenamiento, si conviene, en forma de glucógeno. Estas acciones son realizadas a costa de la movilización de aminoácidos y ácidos grasos procedentes, respectivamente, de las proteínas y triglicéridos tanto de la dieta como constitutivos (**Jara-Albarrán, 1988; Bartolomé, 1989**), lo cual puede alterar el peso corporal con independencia de las acciones directas sobre el crecimiento que pudieran ejercer los glucocorticoides. Pensando en esta acción lipolítica de los glucocorticoides sobre el tejido adiposo y en su posible implicación en las alteraciones de peso que hemos discutido, hemos evaluado las modificaciones de los depósitos de grasa subcutánea en tres pliegues de los animales.

2.2. MODIFICACIONES EN LA DISTRIBUCION DE LA GRASA SUBCUTANEA

Los valores correspondientes a la grasa subcutánea de los pliegues escapular, del lomo y de la pata trasera se exponen en la Tabla 5 y se representan en la Figura 8.

La exposición a estrés sonoro no modifica, respecto al grupo control, el contenido en grasa subcutánea en ninguno de los tres pliegues considerados. Los tratamientos Ac, Dx y DxStr provocan una significativa reducción de los valores de grasa subcutánea ($p \leq 0.001$ vs Co y Str). Los grupos de animales tratados con dexametasona no muestran diferencias significativas entre sí cualquiera que sea el pliegue estudiado y presentan valores de este parámetro más bajos que los mostrados por el grupo Ac ($p \leq 0.001$), a excepción del pliegue de la pata trasera donde no aparecieron diferencias significativas entre estos tres tratamientos experimentales.

GRASA SUBCUTANEA (mm)			
Grupo	Escápula	Lomo	Pata
Co	3.82 ± 0.37 cde	2.82 ± 0.24 cde	2.23 ± 0.13 cde
Str	3.62 ± 0.20 cde	2.93 ± 0.09 cde	2.22 ± 0.11 cde
Ac	2.72 ± 0.29 abde	2.04 ± 0.13 abde	1.34 ± 0.21 ab
Dx	2.02 ± 0.18 abc	1.74 ± 0.13 abc	1.24 ± 0.16 ab
DxStr	1.96 ± 0.21 abc	1.68 ± 0.14 abc	1.26 ± 0.13 ab
Grasa escapular		Grupo experimental F (4,45) = 114.05 p ≤ 0.001	
Grasa lomo		Grupo experimental F (4,45) = 147.37 p ≤ 0.001	
Grasa pata		Grupo experimental F (4,45) = 113.37 p ≤ 0.001	

Tabla 5: Grasa subcutánea de los pliegues de la escápula, lomo y pata trasera.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

Nuestros resultados indican una movilización de estas reservas tanto más intensa cuanto mayor es la intensidad de la acción glucocorticoide causada por los tratamientos.

Esta movilización de reservas es congruente con el evidente incremento de la actividad metabólica generado por la acción de los glucocorticoides y que aparece confirmado en estudios previos en los que evaluamos el contenido de glucógeno hepático, no sólo en condiciones similares en cualquier aspecto a las aquí descritas sino también en hembras tratadas durante la gestación. En estos estudios (Velasco, 1990; Alario, 1991) observamos que todos los grupos experimentales incluido el estrés mostraban unos niveles de glucógeno hepático marcadamente elevados, pero que permitían distinguir además la diferente intensidad de la acción glucocorticoide representada por los distintos tratamientos. En cualquier caso, con nuestros resultados actuales, dicha activación metabólica encontrada en los animales expuestos al estrés no ha provocado una movilización de su grasa subcutánea que, sin embargo, se manifiesta claramente a partir del tratamiento con ACTH.

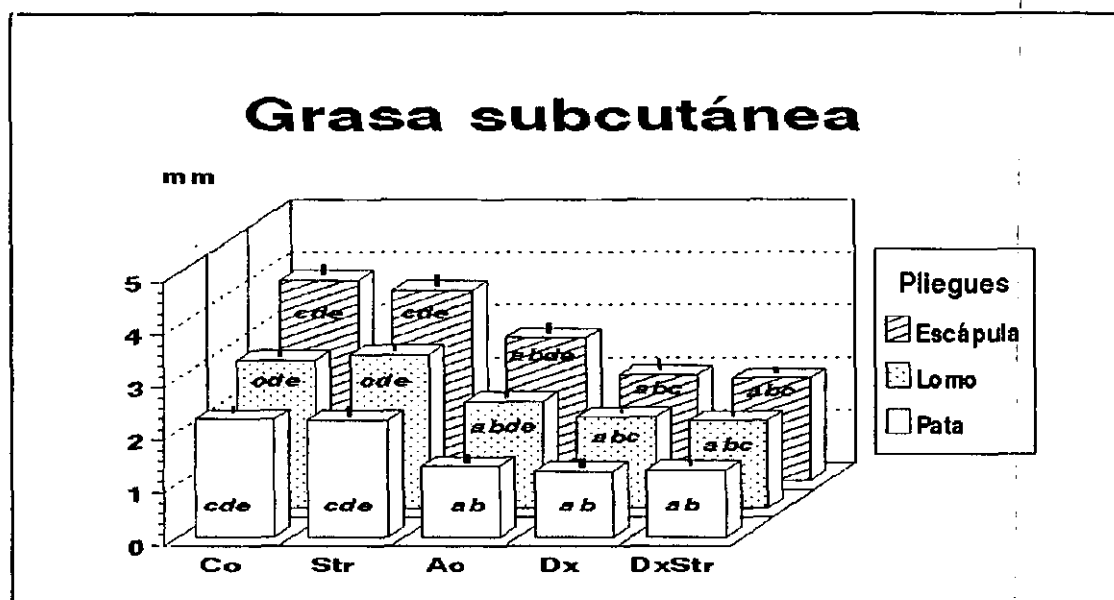


Figura 8: Grasa subcutánea de los pliegues de la escápula, lomo y pata trasera

Los datos obtenidos muestran asimismo que los pliegues escapular y del lomo resultan más afectados por la acción de los tratamientos que el pliegue de la pata, hasta el punto de que en éste los tratamientos de mayor intensidad no muestran diferencias entre sí. La menor susceptibilidad del depósito de grasa de la pata podríamos en parte explicarla por ser generalmente de todos ellos el que presenta menor acúmulo de grasa dada la implicación de la extremidad en la locomoción.

En conjunto, tanto las alteraciones de la ganancia de peso como de la distribución metabólica de grasa subcutánea, causadas por nuestros modelos experimentales, constituyen unos efectos concordantes entre sí y cuya intensidad se correlaciona con la mayor o menor intensidad glucocorticoide desencadenada en cada caso. De acuerdo con estos resultados parece claro que la utilización, como materia prima para la gradual activación metabólica ejercida por los glucocorticoides, de la grasa almacenada podría ser la causa de los cambios encontrados en la ganancia de peso.

Es esta relación entre los parámetros hasta ahora discutidos la que nos

conduce a valorar qué está sucediendo con la ingesta de nuestros animales ya que, es evidente, que la dieta representa el aporte de constituyentes tanto para el metabolismo como para el crecimiento y condiciona la posibilidad de adelgazamiento del organismo. Por consiguiente, la elevada demanda metabólica mediada por los glucocorticoides debe ser compensada por un aumento de la ingestión de alimento. Si tal equilibrio no se alcanza, es cuando la activación metabólica provocada podría llegar a afectar a la distribución de la grasa corporal con pérdida de peso. Además, una insuficiente ingesta de nutrientes puede conducir a una reducción del crecimiento.

Por otra parte, y en relación con la ingesta, los efectos anoréxicos de los glucocorticoides han sido ampliamente considerados en las situaciones de estrés. Sin embargo, es conocida la existencia de una notable controversia a este respecto. Así hay casos en los que ciertos modelos de estrés están asociados a la aparición de efectos anoréxicos (**Armario y cols., 1984b; Alario y cols., 1987b; García-Márquez y Armario, 1987**), mientras que en modelos con intensidad y secreción de glucocorticoides similares no acontecen dichas acciones (**Kuroshima y cols., 1984; Gamallo y cols., 1986a; Adell y cols., 1990**). Estos resultados enfrentados son explicados como consecuencia de que diferentes modelos de agentes estresantes implican distintos patrones de integración nerviosa, previos a la estimulación neuroendocrina, con independencia de su intensidad. Lo cual incidiría de forma específica en la anorexia ligada no a la acción glucocorticoide sino a los sistemas de control nervioso central.

Por consiguiente la ingesta puede analizarse desde diferentes posibles comportamientos. Así puede estimularse para compensar una demanda metabólica clara o bien no hacerlo, con los evidentes efectos sobre el animal que deberá mantener la activación metabólica a costa exclusivamente de sus propios tejidos. Pero también podría incluso verse reducida si se produjese el mencionado efecto anoréxico descrito, en cuyo caso, las repercusiones sobre la pérdida de grasa corporal y/o crecimiento serían más drásticas.

Vemos, por tanto, lo importante que es conocer si nuestros tratamientos están modificando la ingesta de los animales y si esto a su vez está incidiendo finalmente en su peso corporal. Con este propósito evaluamos la ingesta absoluta y relativa.

2.3. POSIBLES EFECTOS DE LA INGESTA DE COMIDA

Los valores de la ingesta media de comida absoluta y relativa al peso de los animales se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 9.

Los resultados de la evolución de la ingesta absoluta y relativa se representan en las Figuras 10 y 11 respectivamente. La comparación estadística de estos resultados mediante respectivos ANOVAs de dos vías ofreció los siguientes resultados: en la comparación entre los grupos experimentales, para la ingesta absoluta se obtuvo una $F(4,45) = 91.1$ ($p \leq 0.001$) y para la relativa fue de $F(4,25) = 16.3$ ($p \leq 0.001$); en la comparación entre días, para la ingesta absoluta fue de $F(10,55) = 13.9$ ($p \leq 0.001$) y en la relativa de $F(4,25) = 2.9$ ($p \leq 0.05$); los resultados de la interacción fueron respectivamente de $F(40,55) =$ ($p \leq 0.001$) y $F(6,25) = 7.36$ ($p \leq 0.001$).

3.0

INGESTA		
Grupo	Absoluta (g/día)	Relativa (mg/g x día)
Co	18.2 ± 2.4 de	65.2 ± 6.8 cde
Str	18.1 ± 1.6 de	64.6 ± 3.7 cde
Ac	17.8 ± 1.4 de	74.1 ± 7.1 ab
Dx	14.0 ± 1.5 abce	73.5 ± 7.8 ab
DxStr	14.6 ± 1.5 abcd	74.3 ± 9.5 ab
Ingesta absoluta	Grupo experimental $F(4,45) = 38.32$ $p \leq 0.001$	
Ingesta relativa	Grupo experimental $F(4,45) = 5.35$ $p \leq 0.001$	

Tabla 6: Ingesta media de comida absoluta y relativa.

Los datos indican la media \pm desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

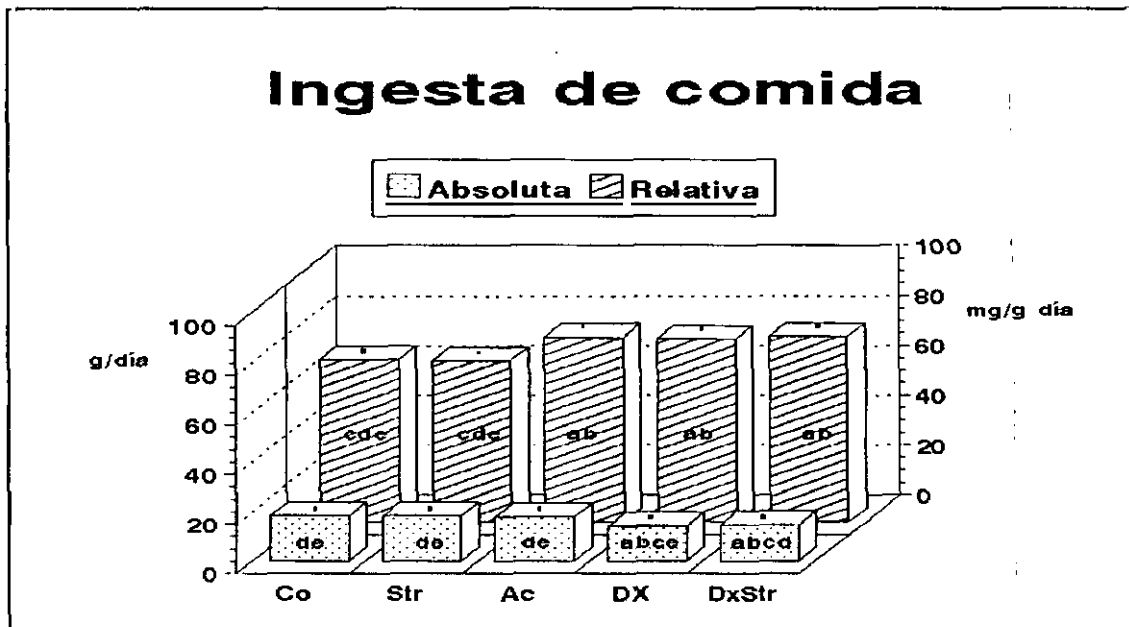


Figura 9: Ingesta media de comida absoluta y relativa.

Los resultados de la ingesta media de comida muestran que los animales expuestos a estrés sonoro así como aquellos a los que se les administró ACTH no presentan diferencias significativas en la ingesta absoluta respecto al grupo control. La evolución de este parámetro durante el periodo de tratamiento tampoco muestra diferencias significativas entre estos grupos. Sin embargo, la ingesta relativa al peso fue en el grupo Ac significativamente superior a la de los grupos Co y Str ($p \leq 0.001$), así como también lo fue la evolución de la ingesta relativa durante todo el periodo ($p \leq 0.001$). En los grupos Dx y DxStr la ingesta absoluta fue significativamente inferior a la de los grupos Co, Str y Ac ($p \leq 0.001$), siendo este parámetro superior en el grupo DxStr que en el Dx ($p \leq 0.05$). En el caso de la ingesta relativa los resultados muestran que las diferencias entre ambos grupos desaparecen siendo significativamente superior a la de los grupos Co y Str ($p \leq 0.001$), pero similares a la del grupo Ac. La evolución temporal de la ingesta durante el tratamiento indica que en los grupos Dx y DxStr la ingesta absoluta fue significativamente inferior a la del control ($p \leq 0.001$) mientras que la relativa al peso de los animales fue mayor ($p \leq 0.001$). La comparación entre sí de estos grupos muestra que la evolución de la ingesta de ambos fue similar, apreciándose una

reducción al inicio de los tratamientos que posteriormente se va recuperando e incluso aumenta al final de dicho periodo.

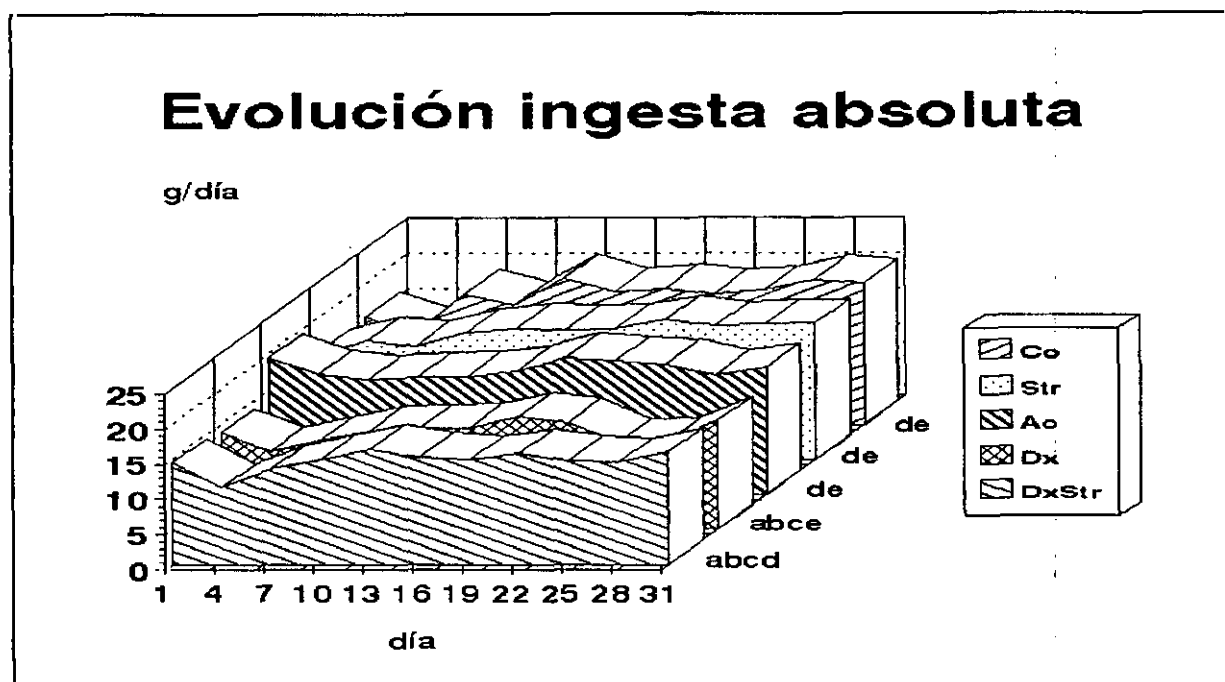


Figura 10: Evolución de la ingesta de comida absoluta.

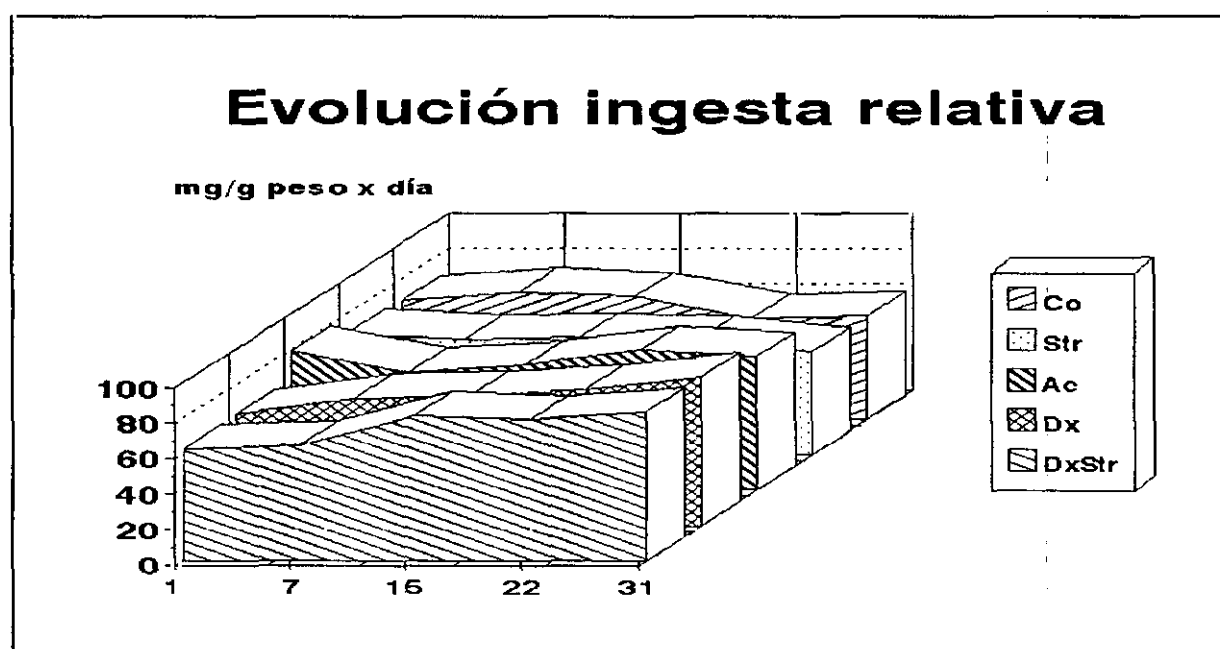


Figura 11: Evolución de la ingesta de comida relativa.

Vamos a discutir en primer lugar los resultados concernientes a la ingesta absoluta.

Observamos que la estimulación metabólica de los animales expuestos a estrés (Velasco, 1990; Alario, 1991) no se acompaña de un aumento de su ingesta, sino que ésta permanece inalterada al igual que ya hemos visto sucede con su ganancia de peso durante todo el tratamiento, tampoco se manifiestan efectos anoréxicos de signo contrario. Evidentemente, estos animales no incrementan su ingesta porque ésta es suficiente para hacer frente a una actividad metabólica levemente estimulada. Si no fuese así deberíamos observar alteraciones en su peso, que por el contrario, como ya hemos discutido, no reflejan ni los resultados de la ganancia de peso acumulada ni los relativos a la evolución temporal de ese parámetro. Con este conjunto de datos se entiende la ausencia de la movilización de grasa subcutánea en estos animales.

Si a continuación nos fijamos en los datos obtenidos en los animales tratados con ACTH, vemos que asimismo no modifican su ingesta. Por otra parte, los resultados relativos a los niveles circulantes de corticosterona y al contenido de glucógeno hepático en estos animales nos están indicando que, a diferencia de lo que ocurre en los animales estresados, la estimulación metabólica que muestran es más acentuada. El desequilibrio activación metabólica-ingesta explicaría por lo tanto su movilización de grasa subcutánea y quizás su pérdida de peso.

Cuando la acción glucocorticoide se intensifica, caso de la administración de dexametasona, los resultados muestran ahora sí una alteración de la ingesta absoluta de forma que ésta se reduce. Es decir, en estos animales no sólo la ingestión de alimento no aumenta como sería de esperar en respuesta a una actividad metabólica incrementada, sino que además comen menos. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en relación a su ganancia de peso hasta tal punto que observamos una evolución temporal coincidente, de forma que estos animales comen menos y presentan no ya una disminución de su ganancia de peso sino evidentes pérdidas durante todo el periodo experimental, acentuándose la disminución de su ingesta en la primera semana, precisamente el mismo periodo semanal en que pierden más peso.

De todos estos resultados concluimos que, tanto en los animales

tratados con ACTH como en aquellos administrados con dexametasona, la estimulación metabólica genera una demanda de nutrientes que como hemos visto no se satisface bien porque la ingesta no varía, caso de los animales tratados con ACTH, bien porque incluso disminuye, caso de aquellos tratados con dexametasona. Como consecuencia, el organismo de estos animales recurre a sus reservas en forma de grasas produciéndose alteraciones en el peso tanto más intensas cuanto mayor es la intensidad de la acción glucocorticoide representada por el tratamiento y que sólo en los animales tratados con dexametasona están acompañadas de un efecto anoréxico debido a los glucocorticoides. Por su parte, los resultados obtenidos en los animales estresados son esperables de acuerdo con el carácter moderado de nuestro modelo de estrés y así estos animales mantienen su peso aunque su ingesta no se altere porque su demanda metabólica es baja.

A continuación vamos a comentar los resultados de la ingesta relativa. Como veremos, tener en consideración ambos parámetros, ingesta absoluta y relativa, resulta esencial a la hora de una correcta interpretación de los resultados.

Los datos muestran que en los animales estresados la razón ingesta/peso corporal no se modifica, lo cual resulta lógico a la luz de los resultados previamente discutidos. Efectivamente, en estos animales ni su ingesta absoluta ni su peso se alteraban de forma significativa por acción del tratamiento estresante, resultados que se corroboran cuando observamos el índice que los relaciona. Nuevamente resaltamos que bajo estos parámetros de tipo general o global que parecen indicar la ausencia de efectos en el caso del estrés, nos encontraremos posteriormente alteraciones interesantes que por moderadas quedan enmascaradas.

Sí se modifica en cambio la razón ingesta/peso corporal en los animales tratados con ACTH, aumentando de forma significativa. Este aumento es consecuencia de que la ingesta absoluta de estos animales no se modifica mientras que su peso disminuye, lo cual pone de manifiesto que en estos animales se está produciendo un desajuste entre su demanda metabólica y su ingesta de alimento. Incluso cuando acudimos a los resultados de la evolución temporal de su ingesta relativa observamos que estos animales no modifican su ingestión de alimento en todo el periodo experimental, ni siquiera en aquellas semanas en las que pierden peso.

Cuando se intensifica la acción glucocorticoide vemos que, al igual que sucede en los animales tratados con ACTH, la ingesta relativa aumenta pero la interpretación de este resultado es ahora diferente. En este caso ya conocíamos que su ingesta absoluta y su ganancia de peso disminuyen pero el índice nos muestra que ambos parámetros se reducen en diferente proporción, es decir, estos animales pierden más peso de lo que reducen su ingesta.

De todo lo expuesto podemos concluir que el efecto anoréxico asociado a la acción glucocorticoide que representa el tratamiento con dexametasona, y que impide hacer frente a la demanda metabólica que origina, no es por sí sólo el causante de las pérdidas de peso observadas en estos animales. Otros autores concuerdan con nuestra opinión. **LaBorde y cols. (1992)** en un trabajo sobre los efectos de la exposición prenatal a diferentes dosis de dexametasona sobre diversos parámetros de crecimiento, evalúan la posible implicación de un efecto hipofágico de la dexametasona en la reducción de peso corporal materno para concluir que esta alteración no es totalmente atribuible a este efecto supresivo sobre la ingesta. Nosotros hemos encontrado resultados similares al someter hembras gestantes a los tratamientos considerados (**Velasco y cols., 1990**).

En conclusión vemos que la ingesta no es activada, en ningún caso, por la demanda metabólica generada por los glucocorticoides, y que este hecho no es dependiente de la intensidad de esta demanda puesto que no encontramos siquiera un umbral de dicha intensidad en el que la activación se produzca. Esto ocurre porque resulta más importante el efecto anoréxico de los glucocorticoides, que sí se correlaciona perfectamente con el grado de actividad de estas hormonas en los tratamientos, existiendo un umbral de dicha actividad por encima del cual hay reducción de la ingesta. Este umbral puede ser más elevado de lo esperable porque en realidad se produzca una competición entre los factores que tratan de ajustar la ingestión de alimento a la demanda metabólica y los efectos anoréxicos considerados. Sin embargo, y por otra parte, también hemos visto que toda la pérdida de peso del animal expuesto a la mayor actividad glucocorticoide no es consecuencia única de la anorexia encontrada.

Con estos últimos resultados hemos cumplido totalmente lo que nos propusimos en el Objetivo 1a.

Sin embargo, cabe preguntarse ¿puede la estimulación metabólica, y la consecuente distribución de grasa corporal, generada por los glucocorticoides, en asociación con la falta de un ajuste adecuado de la ingesta, o incluso perjudicadas por un efecto anoréxico, ser las únicas causas de las alteraciones observadas en las curvas de ganancia de peso?

Con la intención de conocer la respuesta nos propusimos el Objetivo 1b relativo a otro parámetro de desarrollo corporal como resultan ser las dimensiones de longitud y envergadura.

Consideramos a las dimensiones del animal como las variables más representativas del crecimiento global del mismo puesto que, una demanda metabólica no va a reducirlas de forma directa como a los depósitos grasos o al peso. Sin embargo, nos gustaría resaltar en este momento que el crecimiento puede ser afectado indirectamente por el metabolismo ya que ambos compiten demandando nutrientes, y también de forma directa por la ingesta puesto que ésta debe dar respuesta simultánea a ambas demandas.

2.4. DIMENSIONES CORPORALES

Los valores de las dimensiones corporales aparecen reflejados en la Tabla 7 y se representan en la Figura 12.

La estimulación sonora no modifica frente al control ni la longitud ni la envergadura de los animales. Por el contrario, ambas dimensiones corporales se reducen de forma significativa en aquellos administrados con ACTH ($p \leq 0.001$ vs Co y Str). Los grupos Dx y DxStr muestran asimismo una reducción significativa de ambos parámetros dimensionales ($p \leq 0.001$ vs Co). La reducción de la longitud fue más acusada para estos grupos que para el grupo Ac ($p \leq 0.001$). También fue mayor la reducción de la envergadura pero significativamente sólo en el caso del grupo DxStr ($p \leq 0.01$). Entre los grupos Dx y DxStr no aparecieron diferencias significativas en ninguna de las dimensiones en estudio.

DIMENSIONES CORPORALES (cm)		
Grupo	Longitud	Envergadura
Co	43.2 ± 1.2 cde	16.5 ± 0.6 cde
Str	43.0 ± 1.5 cde	16.4 ± 0.6 cde
Ac	40.4 ± 1.2 abde	15.6 ± 0.7 abc
Dx	38.2 ± 0.8 abc	15.3 ± 0.5 ab
DxStr	39.0 ± 0.8 abc	14.9 ± 0.4 abc
Longitud	Grupo experimental F (4,45) = 42.11 p ≤ 0.001	
Envergadura	Grupo experimental F (4,45) = 13.31 p ≤ 0.001	

Tabla 7: Dimensiones corporales.

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

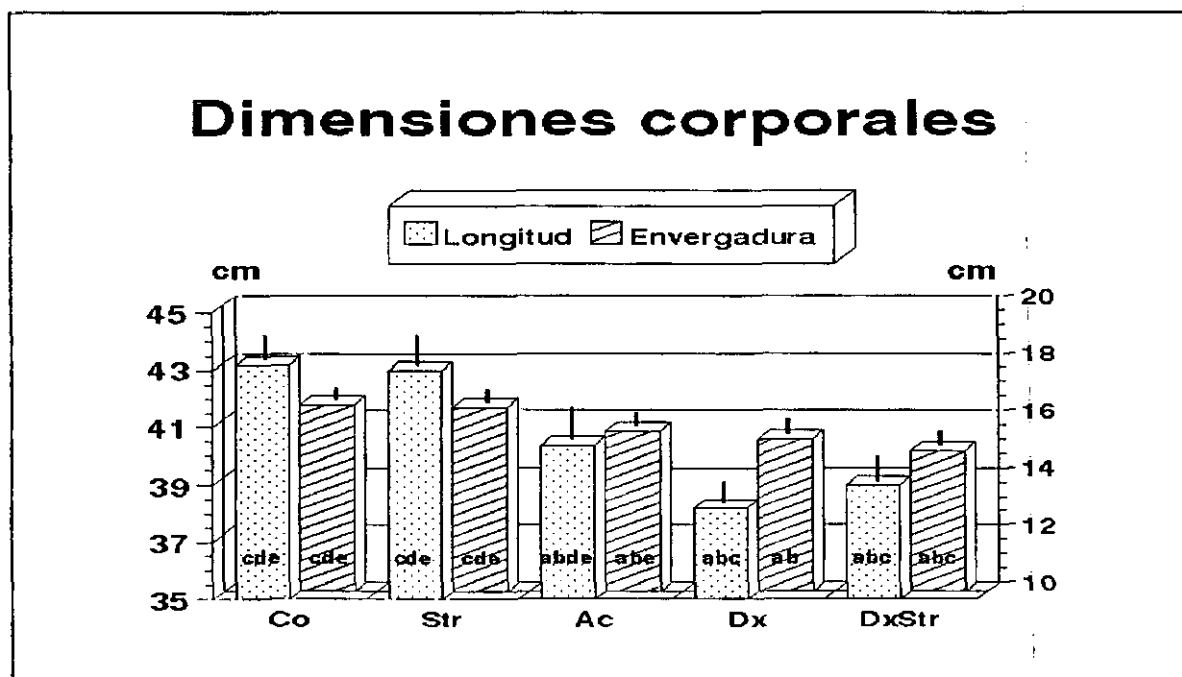


Figura 12: Dimensiones corporales.

Los resultados obtenidos muestran un efecto reductor de las dimensiones evaluadas, y consecuentemente del tamaño corporal de nuestros animales, por los tratamientos empleados, lo que nos acerca más al planteamiento de una reducción de su crecimiento en este periodo con independencia del efecto de "adelgazamiento".

Por otra parte, observamos una vez más la relación entre la intensidad de la acción glucocorticoide y la del efecto reductor sobre ambas dimensiones. De esta forma se verifica la moderada intensidad de la activación corticoadrenal provocada por el estímulo estresante, que no reduce significativamente la magnitud de las mismas. Por lo tanto, el crecimiento de estos animales no parece ser afectado de forma significativa por el tratamiento con ruido lo cual coincide con una leve activación metabólica (glucógeno hepático) y la ausencia de efectos anoréxicos, no siendo necesaria tampoco una activación de la ingesta.

Por el contrario, la superior intensidad de la actividad glucocorticoide del tratamiento con ACTH ocasiona una reducción tanto de la longitud como de la envergadura de los animales, disminuyendo por consiguiente su tamaño corporal. Esta alteración de su crecimiento es congruente con una ingesta que, como vimos, permanece constante no mostrando efectos anoréxicos pero no siendo capaz tampoco de satisfacer ni la demanda de nutrientes derivada del crecimiento, ni la derivada de una actividad metabólica más intensa que la de los animales estresados.

Cuando la acción glucocorticoide corresponde a la de los grupos tratados con dexametasona, también las dos dimensiones corporales consideradas se reducen pero además dicha reducción es más marcada que la de los animales administrados con ACTH, alcanzando valores significativos sólo para la longitud en el caso del tratamiento único con dexametasona y para ambas variables en la exposición conjunta. Vemos así como el comentado efecto anoréxico asociado a la intensidad glucocorticoide de este tratamiento acentúa frente al tratamiento con ACTH no sólo las alteraciones en el peso de estos animales sino también, como podemos observar, el efecto reductor sobre su crecimiento. Si a estos resultados asociamos los referidos a la ingesta relativa de los animales tratados con dexametasona los cuales nos conducían a pensar que su pérdida de peso no era consecuencia única de la anorexia padecida, podemos concluir que las alteraciones en su crecimiento están efectivamente incidiendo también en esa pérdida de peso. Esta conclusión no podía ser obtenida de los resultados concernientes a la ingesta relativa de los animales tratados con ACTH ya que a

través de ellos lo que conocíamos es que el peso disminuía al no ser la ingesta suficiente para atender las demandas de un metabolismo activado pero nos quedaba la duda de si también estaba implicada la reducción que muestra el crecimiento de dichos animales.

Nuestros resultados son consecuentes con los efectos observados por **LaBorde y cols. (1992)** sobre el crecimiento fetal cuando administran dexametasona a ratas gestantes, disminuyendo la longitud del húmero y del fémur, huesos largos indicadores respectivamente de la envergadura y alzada de los animales. En general coinciden también con todos aquellos trabajos que muestran efectos adversos del exceso de glucocorticoides sobre la maduración y el crecimiento del esqueleto, acciones que van a tener un reflejo más acusado durante los periodos de crecimiento sobre las dimensiones corporales, esencialmente la estatura (**Avioli, 1993; Grunt y Scharzt, 1992**). A pesar de ello, tales acciones deberán ser contempladas en un contexto más amplio que el propio esqueleto, considerando los efectos reguladores de estas hormonas sobre el crecimiento y desarrollo de múltiples órganos: riñón, encéfalo, pulmón, intestino... (**Bellabarba y cols., 1983; Meyer, 1987; Navarro y cols., 1989**).

Sin embargo es cierto que las dimensiones corporales de un animal guardan una estrecha relación con las dimensiones de las estructuras esqueléticas implicadas, pues no olvidemos que fundamentalmente el crecimiento somático va a producirse a expensas del crecimiento óseo. Quizás, llegado este momento, convenga reflexionar sobre el sentido biológico de nuestros resultados partiendo del significado que, desde el punto de vista corporal y morfológico, tienen las dimensiones somáticas por nosotros analizadas.

En el campo de la Antropología los términos talla y estatura o longitud pueden ser equivalentes si se incluye la extremidad inferior, cuya longitud y la de sus huesos largos (fémur y tibia) definen en mayor grado dicha dimensión somática. Valgan como ejemplo de lo dicho las clásicas fórmulas usadas en estudios antropológicos (**Genovés, 1967; Trotter y Gleser, 1958**), que permiten estimar la estatura de una persona a partir de las dimensiones de su fémur o tibia. Sistemas de estimación que, a pesar de ser muy antiguas, siguen siendo perfectamente vigentes en los modernos estudios paleoantropológicos (**Cleuvenot y Houët, 1993; Giles, 1993**). Además, en el hombre, la columna vertebral acaba en la zona de arranque de las extremidades inferiores, por lo que la adición de estas dos medidas a la altura de la cabeza configuran la estatura del individuo, a diferencia de los animales, en los que

generalmente la columna vertebral se prolonga más allá del tronco propiamente dicho.

Sin embargo, la talla de un animal definida por su longitud, puede inducir a errores de interpretación, puesto que no necesariamente se relaciona con las dimensiones de la extremidad y de los huesos largos que la integran. Así ocurre en nuestro caso, donde la dimensión "longitud" abarca desde el extremo anterior del hocico del animal en *decúbito prono* hasta el extremo de la cola. Corresponde, por lo tanto, a la longitud total de la cabeza (que no a su altura) junto con la longitud total de la columna vertebral, considerada ésta como eje longitudinal central del tronco y cola. Por consiguiente no incluye a las extremidades, no puede relacionarse con las dimensiones de los huesos largos de las mismas y no representa en absoluto la alzada del animal.

Nuestro caso no es único, pues es habitual, cuando se trata de animales de locomoción tetrápoda, el referirse a la longitud corporal y a la estatura o alzada como conceptos estrictamente distintos. Resulta difícil, no obstante, tomar la estatura de una rata, como se haría con la alzada de un perro o de un caballo, por motivos que resultan evidentes para quien esté habituado a trabajar con estos animales.

Su locomoción y su postura sobre las cuatro extremidades, ya que la rata puede erguirse y dar algunos pasos en bipedestación, no incluye nunca el estiramiento total de la extremidad posterior debido a que las extremidades anteriores son notablemente más cortas. Por otra parte, la distribución y características de la piel que recubre la pata trasera y el abdomen, impiden apreciar objetivamente el grado de estiramiento de dicha extremidad, por lo que la observación de esta medida estaría sujeta a una notable subjetividad por parte de cada observador y sería escasamente reproducible. Todo lo expuesto nos motivó a descartar esta posibilidad en nuestro trabajo.

Sí bien la dimensión longitud de nuestras ratas no puede relacionarse con los huesos largos de las extremidades, en este sentido lo que hemos definido como "envergadura" sí es una dimensión dependiente directamente de la longitud de la extremidad anterior y, por lo tanto, relacionable con la longitud de sus huesos largos, en especial el húmero por ser el que más contribuye.

Así concluimos que nuestros animales, afectados por los tratamientos

en su crecimiento, son como resultado globalmente más "cortos", y tienen una extremidad anterior también más corta, pero no podemos, con nuestros datos, conocer si son más "bajos" a resultas de un presumible acortamiento de su extremidad posterior.

En resumen, tanto las dimensiones corporales consideradas como la ganancia de peso y los depósitos de grasa subcutánea, previamente discutidos, presentan en respuesta a nuestros tratamientos un comportamiento similar. Ello significa no sólo que encontramos una correlación entre la intensidad de los efectos hallados sobre estas variables y la intensidad creciente de la acción glucocorticoide representada por los diferentes tratamientos, sino también que la capacidad de respuesta de estas variables a los mismos nos permite vincular los efectos encontrados exclusivamente a la presencia de elevados niveles circulantes de glucocorticoides ya que, tal y como se recoge en parte del Objetivo 1, el diseño de nuestros tratamientos consigue excluir sistemáticamente escalones de activación del eje HHA implícitos en el estrés. Así en los animales tratados con ACTH se excluye cualquier activación neurógena provocada por el estrés y en los tratados con dexametasona se excluye además acciones derivadas de los niveles hipotálamo-hipofisarios.

Podemos, por tanto, asociar a estos tratamientos alteraciones en el peso, metabolismo y tamaño corporal, poniéndose de manifiesto la existencia de una interrelación, de modo que en la reducción de peso encontrada están incidiendo, al menos de una forma parcial, tanto la activación metabólica a través del consumo y redistribución de la grasa corporal, y por tanto el consiguiente "adelgazamiento" de los animales, como las modificaciones del crecimiento global del animal. Probablemente ambos procesos, adelgazamiento y reducción del crecimiento están siendo afectados por el metabolismo elevado y los desajustes en la ingesta, incluso efectos anoréxicos encontrados a alta intensidad de acción glucocorticoide, pero también podemos pensar que los glucocorticoides ejerzan acciones directas sobre las células en crecimiento.

Teniendo siempre muy presente nuestro Objetivo 1, los parámetros que hasta el momento hemos evaluado nos han proporcionado una visión de las modificaciones de crecimiento y desarrollo que están sucediendo en los animales, considerados éstos de forma íntegra, y que están vinculadas a una acción glucocorticoide elevada. El estudio de los órganos que a continuación vamos a discutir nos va a permitir ampliar esta visión, conociendo si los efectos ya comentados se hacen también extensivos al nivel de los compartimentos

individuales del animal y, en consecuencia, confirmará o dará respuesta además a cuestiones suscitadas en el transcurso de esta discusión:

Por un lado, nos va a permitir abordar un papel de los glucocorticoides sobre el crecimiento a nivel de los tejidos, confirmando así con otros datos los efectos observados sobre el crecimiento de los animales. Recordemos las alteraciones de las dimensiones corporales halladas en ellos y asociadas a un aumento de la actividad glucocorticoide.

Por otra parte, nos permitirá responder con mayor contundencia de lo que podríamos hacerlo a la vista sólo de los resultados de las dimensiones corporales, a la pregunta que dejábamos planteada acerca de si parte de los cambios encontrados en el peso de los animales podrían ser consecuencia de un efecto del tratamiento correspondiente sobre el crecimiento, y no sólo sobre su capacidad de engordar o adelgazar.

Estas ideas corresponden a la Hipótesis 2 y al segundo Objetivo general de esta Tesis que a su vez fue subdividido en diversos objetivos parciales.

3. ALTERACIONES DEL DESARROLLO DE LOS ORGANOS

La elección de estos órganos la hemos realizado atendiendo a su destacada representatividad de las funciones internas más importantes. Hemos descartado el hígado obviamente por ser el órgano diana de la acción metabólica de los glucocorticoides, los cuales provocarían en su caso un efecto contrario al derivado de alteraciones del crecimiento. A este respecto ya hemos comentado resultados previos en los que demostramos un aumento del contenido hepático de glucógeno, y en consecuencia, del tamaño de este órgano por efecto de los tratamientos. Tampoco debe ser considerada la musculatura ya que es sabido que estas hormonas movilizan en su acción metabólica, además de los depósitos de grasa del individuo, el contenido proteico muscular como fuente de recursos para su actividad hepática, no siendo por lo tanto representativa de las posibles alteraciones del crecimiento.

3.1. ALTERACIONES EN EL PESO DE LOS ORGANOS Y SU INCIDENCIA EN EL PESO CORPORAL

Los valores correspondientes a los pesos de los órganos evaluados se muestran en la Tabla 8 y en las Figuras 13 y 14, habiéndose evaluado en primer lugar los pesos absolutos y posteriormente su relación con el peso del animal (pesos relativos).

PESOS DE ORGANOS						
	Encéfalo		Corazón		Riñones	
Grupo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
Co	2094 ± 72 bcde	6.3 ± 0.4 cde	870 ± 84 de	2.6 ± 0.2 cde	1978 ± 191 de	5.8 ± 0.2 cde
Str	2021 ± 58 acde	6.3 ± 0.5 cde	847 ± 95 de	2.6 ± 0.2 cde	1888 ± 139 de	5.7 ± 0.2 cde
Ac	1966 ± 26 abe	8.3 ± 0.6 abde	812 ± 87 de	3.4 ± 0.3 abc	1825 ± 248 de	7.7 ± 0.6 abde
Dx	1929 ± 60 ab	10.4 ± 0.9 abc	634 ± 35 abce	3.4 ± 0.2 abc	1533 ± 106 abc	8.3 ± 0.7 abc
DxStr	1884 ± 48 abc	10.0 ± 0.8 abc	705 ± 75 abcd	3.7 ± 0.2 abcd	1574 ± 133 abc	8.3 ± 0.6 abc
Abs.	Grupo experimental F (4,45) = 22.20 p ≤ 0.001		Grupo experimental F (4,45) = 16.53 p ≤ 0.001		Grupo experimental F (4,45) = 13.20 p ≤ 0.001	
Rel .	Grupo experimental F (4,45) = 85.66 p ≤ 0.001		Grupo experimental F (4,45) = 63.38 p ≤ 0.001		Grupo experimental F (4,45) = 66.50 p ≤ 0.001	

Tabla 8: Pesos absoluto (mg) y relativo (mg/g) de órganos.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

Respecto al peso absoluto, la exposición a estimulación sonora causa en el encéfalo una reducción significativa ($p \leq 0.01$ vs Co) de este parámetro, no sucediendo así en los otros órganos evaluados, donde no se observan modificaciones significativas en tal sentido. Los animales tratados con ACTH muestran una reducción del peso absoluto del encéfalo ($p \leq 0.001$ vs Co) más acentuada que la de los expuestos al tratamiento estresante ($p \leq 0.05$ vs

Str). Por su parte, la acción de la administración de ACTH no difiere para los pesos absolutos del corazón y de los riñones ni respecto al control, ni frente al tratamiento con ruido. La administración de dexametasona reduce el peso absoluto del encéfalo, corazón y riñones ($p \leq 0.001$ vs Co y Str), no apareciendo diferencias significativas entre los grupos Dx y Ac en el caso del encéfalo, pero sí en el caso del corazón y de los riñones ($p \leq 0.001$). El tratamiento conjunto de dexametasona y estrés por ruido causa una reducción del peso absoluto de los tres órganos en estudio ($p \leq 0.001$ vs Co y Str, $p \leq 0.01$ vs Ac). Sólo sobre el corazón, los tratamientos Dx y DxStr difieren en sus efectos sobre este parámetro de tal modo que, al contrario de lo esperado, la reducción observada en el grupo DxStr fue significativamente menos acentuada ($p \leq 0.05$) que la evidenciada en el grupo Dx.

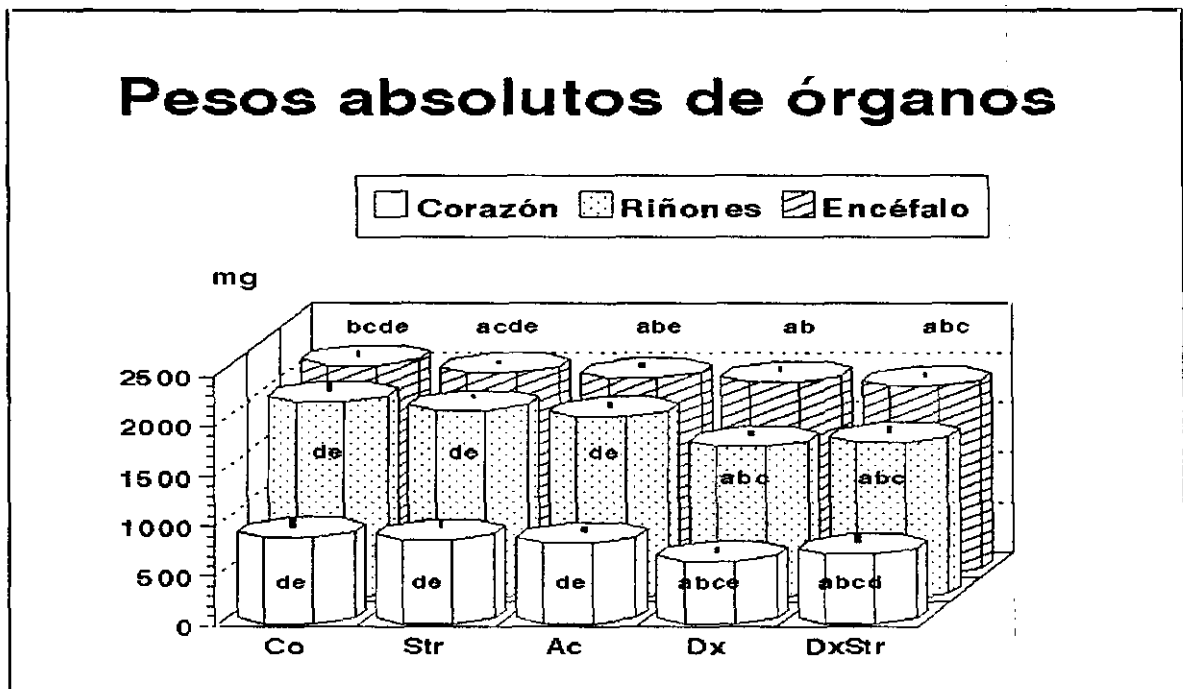


Figura 13: Pesos absolutos del corazón, riñones y encéfalo.

Cuando el peso de los órganos se hace relativo al peso corporal, los animales expuestos a estímulo sonoro no muestran ninguna modificación significativa del peso relativo de los órganos estudiados. Por el contrario, cuando se les administra ACTH este parámetro aumenta significativamente ($p \leq 0.001$ vs Co y Str). Asimismo, la administración de dexametasona causa un aumento significativo del peso relativo de los tres órganos ($p \leq$

0.001 vs Co y Str), siendo dicha alteración más acusada en el encéfalo ($p \leq 0.001$) y en los riñones ($p \leq 0.05$) que la observada en el grupo Ac, mientras que no aparecen diferencias entre ambos grupos para el peso relativo del corazón. El tratamiento conjunto de dexametasona y estrés por ruido aumenta el peso relativo de los órganos considerados (**encéfalo: $p \leq 0.001$ vs Co, Str y Ac; corazón: $p \leq 0.001$ vs Co y Str, $p \leq 0.01$ vs Ac; riñón: $p \leq 0.001$ vs Co y Str, $p \leq 0.05$ vs Ac**). No se observan diferencias significativas para este parámetro entre los tratamientos con dexametasona excepto sobre el peso relativo del corazón, cuyo aumento es más acentuado en el grupo DxStr que en el Dx ($p \leq 0.01$).

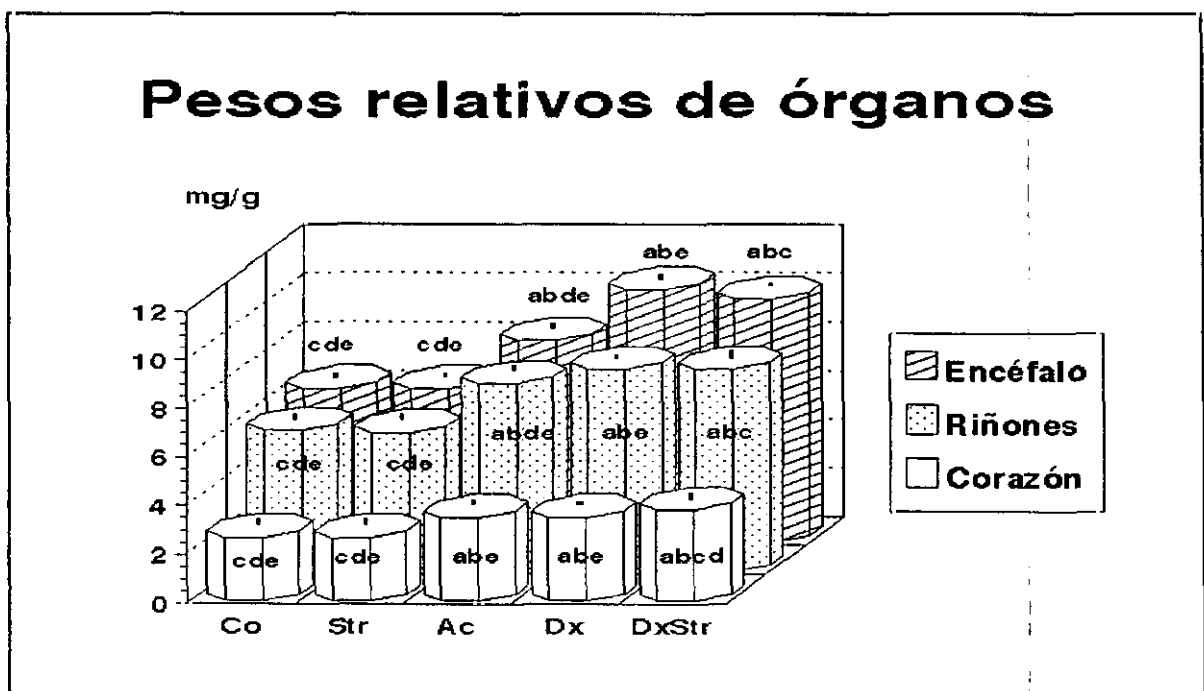


Figura 14: Pesos relativos del corazón, riñones y encéfalo.

De forma global los resultados obtenidos corroboran un efecto de los tratamientos sobre el crecimiento, que no sólo se manifiesta en parámetros representativos de la totalidad del individuo sino también, al menos, en los órganos considerados. No obstante, esta conclusión encierra numerosos y diferentes aspectos de la información que nos proporcionan los resultados obtenidos, por lo que vamos a tratarlos por separado. En consecuencia discutiremos, primero, el efecto de cada tratamiento desde el punto de vista de su intensidad de acción glucocorticoide. En segundo lugar, la diferente susceptibilidad de los órganos evaluados a modificar su crecimiento a la edad de los animales empleados y por

último, el significado biológico de los datos de peso absoluto y relativo.

Respecto al primero de los aspectos que hemos citado, encontramos una reducción del peso absoluto de los órganos en todos los grupos experimentales. Además, estos resultados confirman que la intensidad del efecto de los distintos tratamientos concuerda con la diferente acción glucocorticoide que representan, reproduciéndose el comportamiento observado en los parámetros estudiados anteriormente.

Efectivamente, el efecto del estrés es moderado tal y como lo pone de manifiesto que sólo uno de los órganos evaluados, el encéfalo, muestre una reducción significativa de su peso y además ésta sea de pequeña magnitud. Sin embargo, dicha reducción es un resultado que adquiere gran importancia ya que se produce en unos animales (tratamiento con ruido) en los que, ni la actividad metabólica (recordemos sus elevados niveles de glucógeno hepático), ni la actividad glucocorticoide, conseguían efectos significativos sobre otros parámetros como consecuencia de la propia moderación de dicha activación.

Por su parte, la administración de ACTH ejerce un efecto de mayor intensidad pues aunque también reduce de forma significativa únicamente el peso del encéfalo, sin embargo dicha reducción es más acentuada que la provocada por el ruido. Finalmente, los tratamientos con dexametasona superan los efectos de los tratamientos de menor intensidad reduciendo significativamente no sólo el peso del encéfalo sino también el del corazón y el de los riñones, y siendo estas alteraciones más acentuadas.

Hemos considerado en el párrafo anterior a los dos grupos expuestos al glucocorticoide sintético de forma conjunta, pero si a continuación establecemos una comparación entre ellos encontramos que no se aprecian diferencias en sus efectos a excepción del corazón. En este caso, y al contrario de lo esperado en respuesta a una actividad glucocorticoide creciente, los animales tratados con dexametasona y además expuestos al estímulo sonoro muestran una reducción del peso absoluto de este órgano menos marcada que los animales tratados únicamente con dexametasona. Este resultado será analizado posteriormente con más detenimiento, si bien adelantamos ya que dicha diferencia entre ambos tratamientos nos va a permitir precisar un efecto cardiotrófico debido al estrés.

La correspondencia entre el efecto reductor de nuestros tratamientos y

la intensidad de acción glucocorticoide por ellos representada se manifiesta en los tres órganos en estudio, si bien cuantitativamente el efecto reductor difiere de uno a otro, siendo más acentuado sobre el cerebro que sobre el corazón o los riñones. Ello nos conduce al segundo aspecto relativo a la diferente sensibilidad a ser alterado que parecen mostrar los órganos considerados. Estos datos corresponden a lo planteado en la Hipótesis 2a. Como muestran los resultados, la acción moderada del estrés es capaz de afectar al peso absoluto del encéfalo, pero no al de los otros dos órganos. Para que esto último suceda se requiere una mayor intensidad del tratamiento que no corresponde siquiera a la asociada a la administración de ACTH, sino a la de los tratamientos con dexametasona. Estos resultados manifiestan, como hemos dicho, una diferente sensibilidad de los órganos aquí estudiados a la distinta intensidad glucocorticoide de los tratamientos. De manera que es el encéfalo el más sensible a reducir su peso seguido de los riñones y del corazón, si bien sobre este último puede intuirse la posibilidad de que su desarrollo esté siendo afectado por efectos contrapuestos.

Toda esta información, hasta ahora obtenida en relación con los pesos absolutos, vamos a complementarla con los resultados de los índices o razones que hacen el peso del órgano relativo al peso del individuo, discutiendo así el tercero y último de los aspectos mencionados.

Conviene, quizás, analizar brevemente el concepto de "peso relativo". Este índice permanecerá constante y, en consecuencia, no diferente de los controles en dos casos: uno de ellos, cuando el tratamiento no modifique ni el peso del órgano ni el peso corporal. El otro caso sucederá cuando, por el contrario, ambos factores sean afectados por el tratamiento de forma proporcional y, por consiguiente, el efecto sobre el animal será entonces consecuencia exclusivamente del efecto sobre el órgano. Por lo tanto, la variación significativa de uno de estos índices en grupos que han manifestado alteraciones en ambos factores (órgano considerado y animal) es indicativa de una desproporción de dichas alteraciones, y el sentido en el que se desplace el índice nos señalará quién está siendo proporcionalmente más afectado, animal u órgano.

Considerando este aspecto, recordemos que los resultados obtenidos tras la exposición al ruido mostraban un efecto sobre el peso absoluto del encéfalo. Sin embargo, como ya hemos visto, el peso corporal aunque menor no es reducido de forma significativa respecto al control. Si de esta información pudiera desprenderse que el

tratamiento estresante afecta al peso del encéfalo pero no al del animal, entonces la razón entre ambos debería reducirse y por el contrario observamos que se mantiene constante, no mostrando diferencias con el control. Este resultado pone de manifiesto que efectivamente el peso corporal está siendo reducido de forma moderada, hecho que no se mostraba significativo cuando se consideraba por separado y que sí puede observarse al tener en cuenta la relación entre el peso del órgano y el peso corporal. Es conveniente en este punto insistir en la importante contribución que los índices proporcionan a la discusión de este tipo de estudios.

Continuando con los restantes órganos, los resultados concernientes al peso relativo del corazón y de los riñones muestran que en los animales expuestos al ruido ambos índices también permanecen constantes respecto al control pero, en términos de interpretación, se encuentran afectados por dos hechos. De una parte, que el efecto reductor sobre el animal es moderado y no se manifiesta en el peso y, por otra parte, que su susceptibilidad es menor lo cual hace que no hayan sido afectados significativamente por este tratamiento al igual que tampoco lo serán por la administración de ACTH. De esta forma, la elección del encéfalo como uno de los órganos a evaluar nos ha proporcionado gracias a su mayor sensibilidad una información de gran importancia, pues no hace sino confirmarnos la existencia de efectos debidos al tratamiento estresante que por moderados podrian no ser tenidos en cuenta. Tal es así que esa reducción significativa del peso del encéfalo pasaba desapercibida en el peso total del animal.

En el caso de la administración de ACTH, cuya acción sobre el crecimiento del animal ya hemos visto que es evidente, el encéfalo manifiesta una reducción de su tamaño. Sin embargo, el índice no permanece constante, como sucedía con el estrés, sino que aumenta indicando que el efecto reductor sobre el crecimiento del encéfalo es menor que sobre el crecimiento del animal.

Ello es razonable puesto que hemos demostrado que el peso del animal varía como consecuencia de diversos factores (menor tamaño del animal, adelgazamiento, etc.) a los que ahora se suma la reducción del tamaño del encéfalo.

Respecto al corazón y a los riñones no observamos una alteración de su crecimiento por este tratamiento, órganos que por otra parte hemos mencionado son al parecer menos susceptibles que el encéfalo a mostrar alteraciones en este sentido. Así, en ellos sucede

lo esperable, la razón aumenta significativamente al mantenerse constante el peso de estos órganos pero reducirse el peso del animal. Hay que concluir que la actividad glucocorticoide representada por este estímulo no es capaz de modificar sustancialmente a estos órganos, lo cual confirma que el ruido con niveles de corticosterona menores tampoco lo hiciera.

Por el contrario, en los grupos tratados con dexametasona no sólo se afecta el crecimiento global del animal sino también el de todos sus órganos, y siempre en mayor medida de lo que lo hace el tratamiento con ACTH. Además, el aumento de esta razón nos indica que el efecto sobre el crecimiento del individuo es mayor que sobre los órganos considerados. Evidentemente, esta superior repercusión del efecto reductor sobre el individuo que sobre sus órganos, que también ocurría en el caso del encéfalo de los animales tratados con ACTH, es razonable puesto que el efecto sobre cada una de las partes del individuo contribuye, es de prever, de forma sumativa al efecto sobre el crecimiento del animal, considerado éste en su totalidad. Consecuentemente, los efectos multifactoriales sobre el crecimiento adquieren mayor magnitud en el individuo que en cada uno de los órganos constituyentes. Los animales de cada grupo, con independencia de que presenten afectado el crecimiento de uno o todos los órganos en diferente medida, también presentan distinta activación metabólica, por lo que existen diversos factores alterando su peso (grasa subcutánea, dimensiones, peso de órganos, etc.) y no todos ellos representativos del crecimiento del animal.

Esto ocurre así en nuestros resultados salvo en el caso de la exposición al ruido ya que el carácter moderado de este tratamiento provoca que sólo el órgano más susceptible de los tres estudiados (el encéfalo) vea reducido significativamente su crecimiento y además de forma leve. En este caso, un efecto pequeño y sobre pocas partes del animal hace que las alteraciones queden "diluidas" en la integridad del mismo. En estos animales, la activación metabólica que existe puesto que resultados previos (Velasco, 1990; Alario, 1991) mostraron un aumento significativo del contenido de glucógeno hepático, no generó una movilización significativa de las grasas corporales, quizás porque estos animales no manifestaron efectos anoréxicos y su ingesta fue suficiente para responder a la demanda metabólica. Si además el efecto sobre el crecimiento a nivel de los tejidos es leve, en el supuesto que afecte a más estructuras que el encéfalo, es evidente que no se deje notar en las dimensiones generales del animal.

Por otra parte, merece destacarse la importancia especial que el aumento significativo del peso relativo adquiere en el caso del corazón de los animales del tratamiento conjunto (administración de dexametasona y estrés). En ellos observamos que el peso relativo de este órgano es significativamente mayor que el de los animales tratados únicamente con dexametasona. Este resultado nos está indicando que la reducción del peso del corazón está siendo de alguna forma parcialmente contrarrestada, lo cual apoya la existencia de un posible efecto cardiotrófico vinculado al propio estímulo sonoro. Volveremos a este punto más adelante con nuevos resultados pero, en este momento, cabe plantearse que este efecto debe estar produciéndose también en los animales expuestos sólo a ruido.

Respecto a estas relaciones entre efectos del metabolismo en el peso del animal, su crecimiento y el de sus órganos, aparecen dos situaciones discordantes. Por una parte, podemos encontrar modificaciones significativas en el crecimiento de los órganos sin que se observen, en este sentido, alteraciones en el animal o bien éstas sean moderadas, tal y como hemos discutido en los animales estresados con el encéfalo. Por otro lado, pueden aparecer modificaciones en el animal sin que se aprecien alteraciones en el crecimiento de todos sus órganos, como observamos en los animales tratados con ACTH respecto al corazón y a sus riñones. Estas situaciones se explican si tenemos en cuenta que no evaluamos la totalidad de los órganos del individuo. Nuestros resultados muestran que no todos ellos (tanto los no evaluados como los aquí considerados) presentan la misma susceptibilidad a los efectos que los tratamientos ejercen sobre el crecimiento, bien por tratarse de una peculiaridad intrínseca al órgano, bien por efecto de la edad del individuo y de su estado de desarrollo.

De esta forma puede ocurrir que, aun cuando un órgano de los estudiados pueda ver reducido su crecimiento, la ausencia de tal modificación en el resto de órganos menos susceptibles (tanto evaluados como no) amortigue o enmascare el efecto sobre el crecimiento global del individuo. Sin embargo, al aumentar la intensidad del tratamiento (administración de ACTH) empiezan a verse afectados los distintos órganos en orden a su diferente sensibilidad, en primer lugar el encéfalo del que ya hemos mencionado que parece ser el más sensible y que es significativamente afectado en mayor medida en los animales tratados con ACTH que en los estresados. Posteriormente y de forma más moderada el resto, tanto de los estudiados como posiblemente de los no evaluados, haciendo que el efecto sumativo de estas alteraciones comience a apreciarse en el animal entero tratado con ACTH. Al intensificar aún más los tratamientos, mayor número de órganos resultan afectados, y aquellos que ya lo

estaban lo hacen ahora en superior magnitud. Hecho que se manifiesta globalmente también en un mayor efecto sobre el animal administrado con dexametasona.

En resumen, cuanto mayor número de órganos empiezan a verse afectados más se nota el efecto en el animal entero que en cada uno de sus constituyentes por separado. A esto hay que añadir que al utilizar el parámetro "peso" como representante del animal entero estamos considerando los efectos que sobre el peso tienen los depósitos grasos que son ajenos a factores de crecimiento y que, ya hemos visto, estaban alterados en todos los grupos a excepción de los animales estresados.

Estos resultados, enmarcados en un contexto tisular, se unen a los ya discutidos en relación con las dimensiones corporales para confirmar que una intensidad superior de acción glucocorticoide, aún asociada a situaciones de estrés moderado, puede efectivamente mediar efectos sobre el crecimiento del animal. Esta conclusión es a su vez punto de apoyo para implicar a estos efectos, entre otros, como mediadores en las alteraciones de peso de nuestros animales. Asimismo, los datos obtenidos nos indican que efectivamente, tal y como planteábamos en la Hipótesis 2a, hay una diferente respuesta de unos órganos frente a otros a que su crecimiento resulte alterado. Así, en los animales de esta edad y con los datos disponibles, podemos afirmar que el órgano más sensible en ese sentido resulta ser el encéfalo mientras que el corazón y los riñones se muestran más resistentes a factores que retrasen su crecimiento. Sin embargo, siendo el encéfalo más sensible es también el órgano que alcanza antes el umbral de respuesta (administración de ACTH) y, por lo tanto, su margen de cambio es pequeño. Por el contrario, para los otros dos órganos no encontramos una intensidad de acción glucocorticoide, de entre las asociadas a nuestros tratamientos, que actúe como límite o umbral de tal modo que no podemos conocer cuál es exactamente la amplitud de su margen de cambio.

Por otra parte, cabe comentar que en la discusión de estos resultados se ha otorgado una equivalencia a los términos "peso" y "crecimiento" de los órganos en el sentido de que las alteraciones observadas en el peso de los mismos son el resultado de alteraciones en su crecimiento. Esta suposición debe ser evidentemente confirmada y así lo haremos en función de los datos correspondientes al número y tamaño celular de los tres órganos considerados. Datos que además nos van a permitir profundizar y enriquecer la discusión hasta ahora derivada de los resultados de sus pesos absolutos. Con ello daremos

respuesta al Objetivo 2b en que subdividimos el Objetivo General referente a los órganos.

3.2. ALTERACIONES EN EL CRECIMIENTO DE LOS ORGANOS

La atrofia de un órgano es un término que posee tanto un significado anatómico como funcional. Esta alteración del crecimiento puede ser el resultado de un menor número de células debido a que se afecte la proliferación celular pero también a que se potencie la destrucción de las células del órgano. Por otra parte, la atrofia puede obedecer a un menor tamaño de sus células al impedirse que alcancen su maduración óptima. Los efectos sobre la proliferación y la maduración celular no son excluyentes, si bien resulta lógico que estas etapas del desarrollo muestren una diferente sensibilidad a ser afectadas como consecuencia de su secuenciación en el tiempo. Obviamente, la fase proliferativa es muy intensa al comienzo del desarrollo de los órganos siendo relevada por una fase de crecimiento y diferenciación, alcanzada la cual, las células mantienen, si procede, una actividad de división encaminada ya sólo a asegurar su propia renovación.

La cuantificación del contenido absoluto de ADN y su relación con el contenido constante de ADN de una célula eucariota nos va a permitir evaluar si el número de células es el parámetro afectado, mientras que la valoración del contenido absoluto de proteínas y su relación con el número de células nos señalará qué sucede con el tamaño de las mismas. De esta forma podemos ver como se manifiesta anatómicamente la atrofia sufrida por el órgano. Además, el contenido absoluto de proteínas nos permite discutir dicha atrofia desde el punto de vista funcional.

Vamos pues, para conocer si la atrofia de los órganos es vinculante a una alteración del crecimiento, a medir su contenido absoluto de ADN y proteínas. A partir de esos datos calcularemos, aplicando las fórmulas contempladas en el apartado de Metodología, los índices relativos al número y al tamaño de las células.

Previamente a la descripción de los resultados, vamos a definir los términos con los que designaremos las diferentes alteraciones del crecimiento de los órganos. Con el término **aplasia** haremos referencia a un menor número de células, mientras que con el término **atrofia celular** designaremos un menor tamaño de las células del órgano. A su vez,

conviene recordar que el término atrofia puede asimismo hacer referencia a un menor tamaño del propio órgano. De suceder así, mencionaremos indistintamente **atrofia del órgano y reducción de su peso** por ser ésta una manifestación de su atrofia. En último lugar, la atrofia de un órgano puede ser consecuencia de su aplasia, de la atrofia de sus células o de ambos factores.

Los valores correspondientes al contenido absoluto de ADN y proteínas de los tres órganos estudiados se muestran respectivamente en las Tablas 9 y 10, expresados como medias y desviaciones estándar. Su representación gráfica aparece en las Figuras 15 y 16.

ADN (µg)			
Grupo	ENCEFALO	CORAZON	RIÑONES
Co	2669.41 ± 87.72 bcde	1441.97 ± 149.14 bcde	8245.01 ± 526.70 bcde
Str	2486.59 ± 98.67 ac	1287.08 ± 91.05 acde	7122.47 ± 312.36 ade
Ac	2245.76 ± 21.42 abdc	1130.84 ± 57.27 abd	6908.61 ± 578.15 ade
Dx	2429.22 ± 89.67 ac	869.73 ± 72.57 abcc	5611.70 ± 339.40 abc
DxStr	2494.73 ± 71.37 ac	1031.20 ± 103.54 abd	5923.07 ± 419.76 abc
Sig.	Grupo experimental F (4,20) = 18.63 p ≤ 0.001	Grupo experimental F (4,20) = 24.73 p ≤ 0.001	Grupo experimental F (4,20) = 27.34 p ≤ 0.001

Tabla 9: Contenido absoluto de ADN del encéfalo, corazón y riñones.

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

La exposición a estimulación sonora provoca en los tres órganos evaluados una reducción significativa del contenido absoluto de ADN (**encéfalo: $p \leq 0.01$ vs Co; corazón: $p \leq 0.05$ vs Co; riñones: $p \leq 0.001$ vs Co**). Los animales tratados con ACTH presentan también una reducción de este parámetro frente al grupo control (**$p \leq 0.001$**) siendo más marcada que la de los animales estresados sólo para el encéfalo (**$p \leq 0.001$**) y el corazón (**$p \leq 0.05$**), pues en el caso de los riñones no se encuentran diferencias significativas entre ambos

grupos de tratamiento.

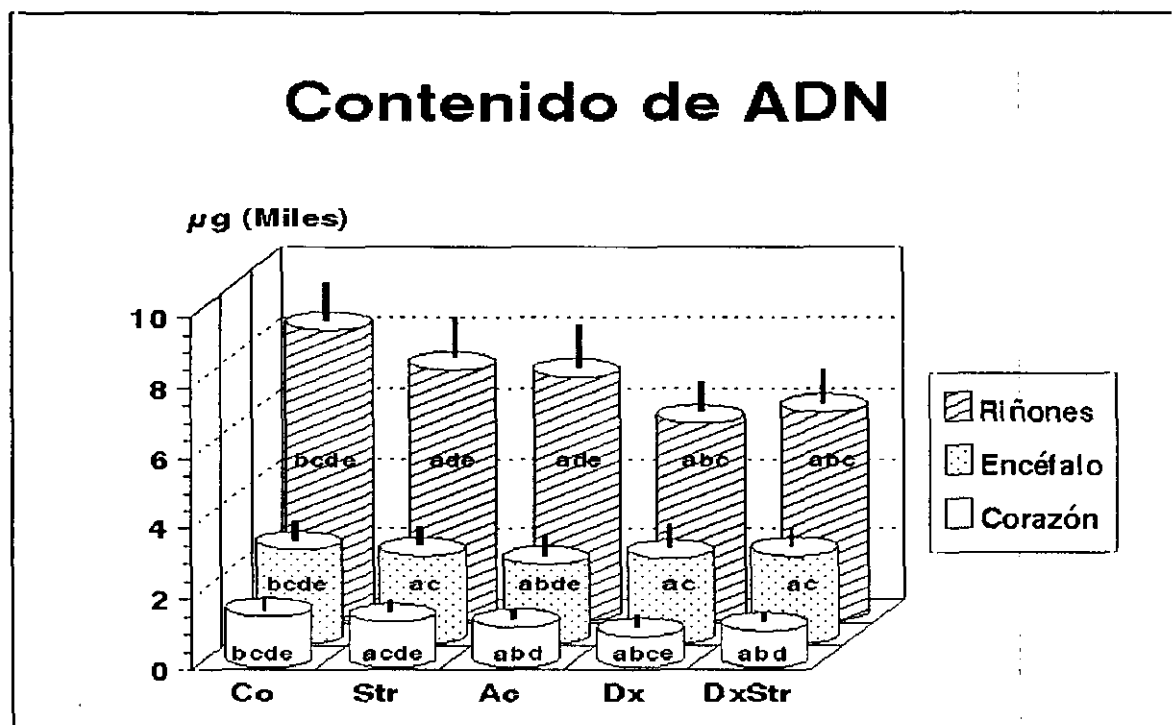


Figura 15: Contenido absoluto de ADN de los órganos.

La administración de dexametasona reduce el contenido absoluto de ADN del encéfalo ($p \leq 0.005$ vs Co), corazón y riñones ($p \leq 0.001$ vs Co) apareciendo diferencias entre los grupos Dx y Ac que consisten en una reducción menos acentuada en el caso del encéfalo ($p \leq 0.01$) y más marcada en el corazón y riñones ($p \leq 0.001$). También se observa un menor contenido absoluto de ADN en el grupo Dx que en el Str en relación al corazón y a los riñones ($p \leq 0.001$). Por su parte, el tratamiento conjunto reduce el contenido absoluto de ADN de los tres órganos respecto al grupo control (**encéfalo: $p \leq 0.01$; corazón y riñones: $p \leq 0.001$**). Cuando se comparan los efectos que sobre dicha variable ejercen los tratamientos con dexametasona se observa que éstos difieren sólo en el corazón, de tal modo que la reducción presentada por el grupo Dx es significativamente mayor que la del grupo DxStr ($p \leq 0.05$).

PROTEINAS (mg)			
Grupo	ENCEFALO	CORAZON	RIÑONES
Co	316.79 ± 12.40 bce	202.84 ± 10.55 de	440.03 ± 30.68 de
Str	254.70 ± 11.44 acd	187.03 ± 20.50 dc	413.05 ± 31.26 dc
Ac	200.12 ± 22.20 abde	185.71 ± 18.89 de	395.09 ± 48.96 de
Dx	296.17 ± 14.87 bce	137.30 ± 8.56 abce	334.31 ± 42.57 abc
DxStr	256.22 ± 15.21 acd	159.33 ± 16.20 abcd	321.66 ± 31.30 abc
Sig.	Grupo experimental F (4,20) = 40.89 p ≤ 0.001	Grupo experimental F (4,20) = 13.79 p ≤ 0.001	Grupo experimental F (4,20) = 9.15 p ≤ 0.001

Tabla 10: Contenido absoluto de proteínas del encéfalo, corazón y riñones.

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

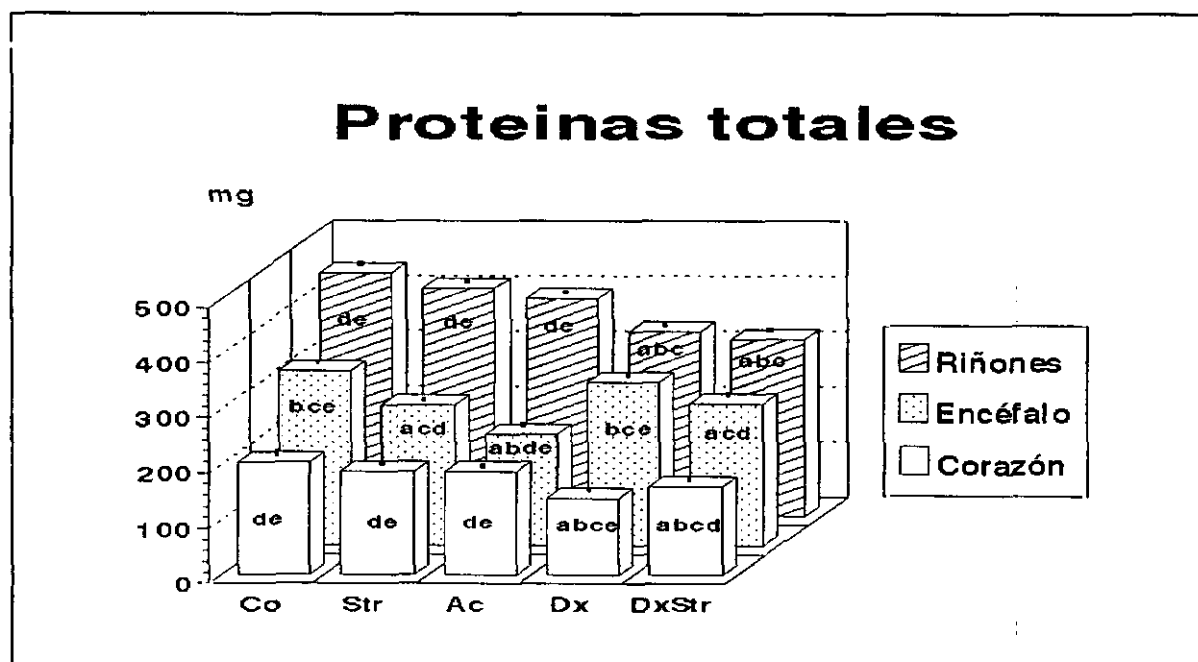


Figura 16: Contenido absoluto de proteínas de los órganos.

En relación con el contenido absoluto de proteínas, se observa que tanto en los animales estresados como en los tratados con ACTH ($p \leq 0.001$ vs Co) dicho parámetro se reduce de forma significativa sólo en el encéfalo, existiendo diferencias entre ambos tratamientos, de modo que la reducción causada por la administración de ACTH es más acusada que la provocada por el estrés ($p \leq 0.001$). El tratamiento con dexametasona, por el contrario, reduce significativamente el contenido absoluto de proteínas del corazón y de los riñones ($p \leq 0.001$ vs Co) mientras que no altera el del encéfalo. Por su parte, el tratamiento conjunto causa una reducción de dicho contenido en los tres órganos estudiados (**encéfalo, corazón y riñones: $p \leq 0.001$ vs Co**), siendo esta alteración sobre el corazón menos acentuada en el grupo DxStr que en el Dx ($p \leq 0.05$).

A continuación analizaremos los datos concernientes a los parámetros número y tamaño de las células. Estos resultados aparecen reflejados en las Tablas 11 y 12 respectivamente, y se representan en las Figuras 17, 18 y 19.

Nº CELULAS (10 ⁶)			
Grupo	ENCEFALO	CORAZON	RIÑONES
Co	430.55 ± 14.15 bcde	232.58 ± 24.05 bcde	1329.84 ± 84.95 bcde
Str	401.06 ± 15.92 ac	207.59 ± 14.68 acde	1148.79 ± 50.38 ade
Ac	362.22 ± 3.46 abde	182.39 ± 9.24 abd	1114.29 ± 93.25 ade
Dx	391.81 ± 14.46 ac	140.28 ± 11.71 abce	905.11 ± 54.74 abc
DxStr	402.38 ± 11.51 ac	166.32 ± 16.70 abd	955.34 ± 67.70 abc
Sig.	Grupo experimental F (4,20) = 18.63 $p \leq 0.001$	Grupo experimental F (4,20) = 24.73 $p \leq 0.001$	Grupo experimental F (4,20) = 27.34 $p \leq 0.001$

Tabla 11: Número de células del encéfalo, corazón y riñones.

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

TAMAÑO CELULAR ($\mu\text{g}/10^6$)			
Grupo	ENCEFALO	CORAZON	RIÑONES
Co	736.91 \pm 48.14 bce	879.29 \pm 101.15	331.44 \pm 22.58
Str	636.45 \pm 49.41 acd	907.51 \pm 144.93	359.94 \pm 29.07
Ac	552.16 \pm 57.13 abde	1020.56 \pm 117.93	356.29 \pm 50.19
Dx	756.53 \pm 43.13 bce	980.73 \pm 42.83	368.24 \pm 27.31
DxStr	636.80 \pm 33.63 acd	965.37 \pm 135.01	336.85 \pm 24.69
Sig.	Grupo experimental F (4,20) = 15.82 $p \leq 0.001$	Grupo experimental F (4,20) = 1.24 ns	Grupo experimental F (4,20) = 1.18 ns

Tabla 12: Tamaño de las células del encéfalo, corazón y riñones.

Los datos indican la media \pm desviación estándar.
Los códigos representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

Los resultados relativos al número de células muestran que el encéfalo, corazón y riñones de los animales expuestos al estímulo sonoro presentan una reducción de este parámetro respecto al grupo control (**encéfalo: $p \leq 0.01$; corazón: $p \leq 0.05$; riñones: $p \leq 0.001$**). Este mismo resultado es el que se observa cuando a los animales se les administra ACTH (**encéfalo y riñones: $p \leq 0.001$; corazón: $p \leq 0.05$**), siendo esta reducción del número de sus células más acentuada que la experimentada por los animales estresados en el caso del encéfalo (**$p \leq 0.001$**) y el corazón (**$p \leq 0.05$**). En el caso de los riñones no se aprecian diferencias significativas entre ambos tratamientos. La administración de dexametasona ocasiona un menor número de células de los tres órganos en estudio (**$p \leq 0.001$ vs Co**), resultando ser este efecto sobre el corazón y los riñones más intenso que el observado en los grupos de animales tratados con estrés y ACTH (**$p \leq 0.001$**). Por el contrario, la reducción del número de células del encéfalo por la administración de dexametasona es menos acentuada que la ocasionada por la administración de ACTH (**$p \leq 0.01$**), no mostrando diferencias significativas frente al tratamiento estresante. El tratamiento conjunto de dexametasona y estrés por ruido causa frente al grupo control una reducción del número de células del encéfalo (**$p \leq 0.01$**), corazón y riñones (**$p \leq 0.001$**). Sólo sobre el corazón se constatan diferencias para este parámetro entre los dos tratamientos con dexametasona, siendo el efecto reductor sobre el

grupo DxStr significativamente menor que el observado en el grupo tratado unicamente con dexametasona ($p \leq 0.05$).

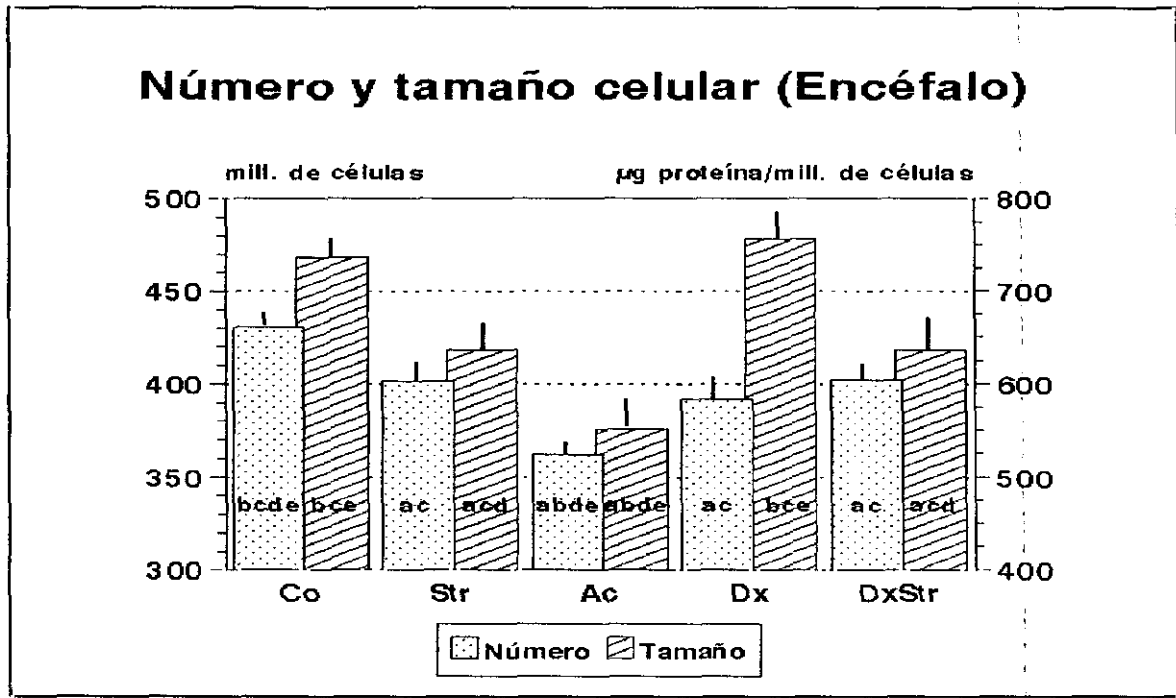


Figura 17: Número y tamaño de las células del encéfalo.

Respecto al tamaño de las células de los órganos estudiados, el tratamiento con ruido provoca una reducción significativa de dicha variable en el encéfalo ($p \leq 0.01$ vs Co) mientras que ningún efecto se observa en relación al corazón y los riñones. Los animales tratados con ACTH muestran asimismo una reducción del tamaño de las células de su encéfalo ($p \leq 0.001$ vs Co), apreciándose una reducción más acentuada en estos animales que en los expuestos al estímulo sonoro ($p \leq 0.05$). El tamaño de las células del corazón y de los riñones no se modifica por la administración de ACTH. El tratamiento con dexametasona no modifica frente al grupo control el tamaño de las células de ninguno de los órganos. En relación a los animales del tratamiento conjunto con dexametasona y estrés se observa una reducción del tamaño de las células del encéfalo ($p \leq 0.01$ vs Co) pero no se evidencia ninguna modificación en el caso del corazón o de los riñones.

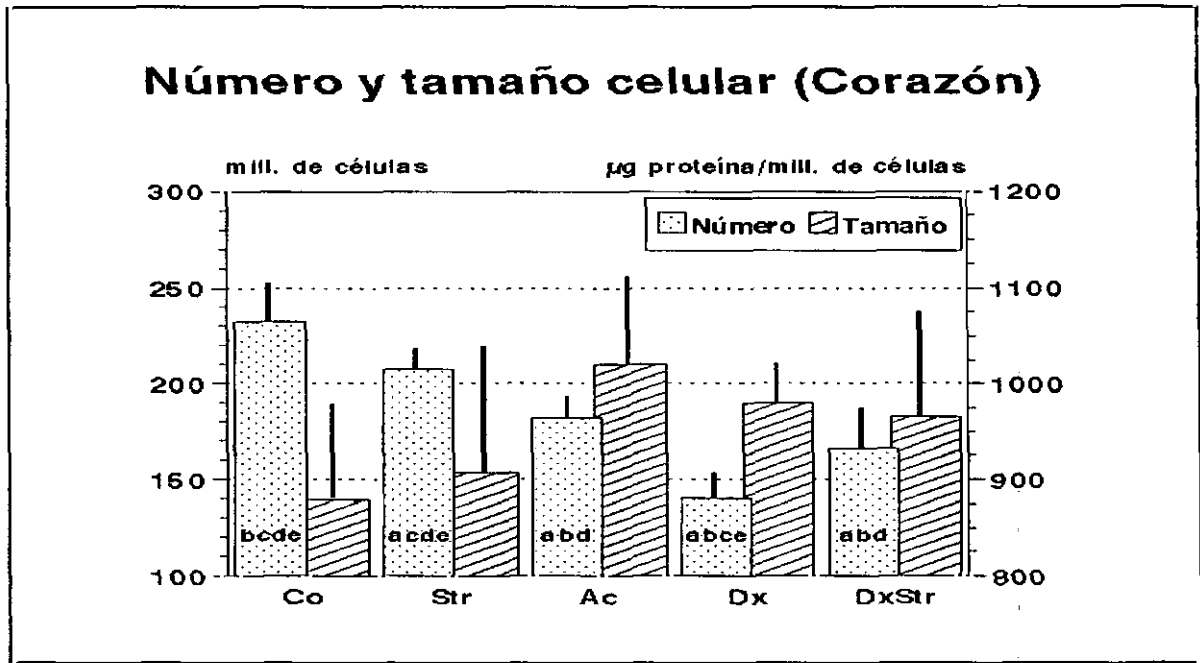


Figura 18: Número y tamaño de las células del corazón.

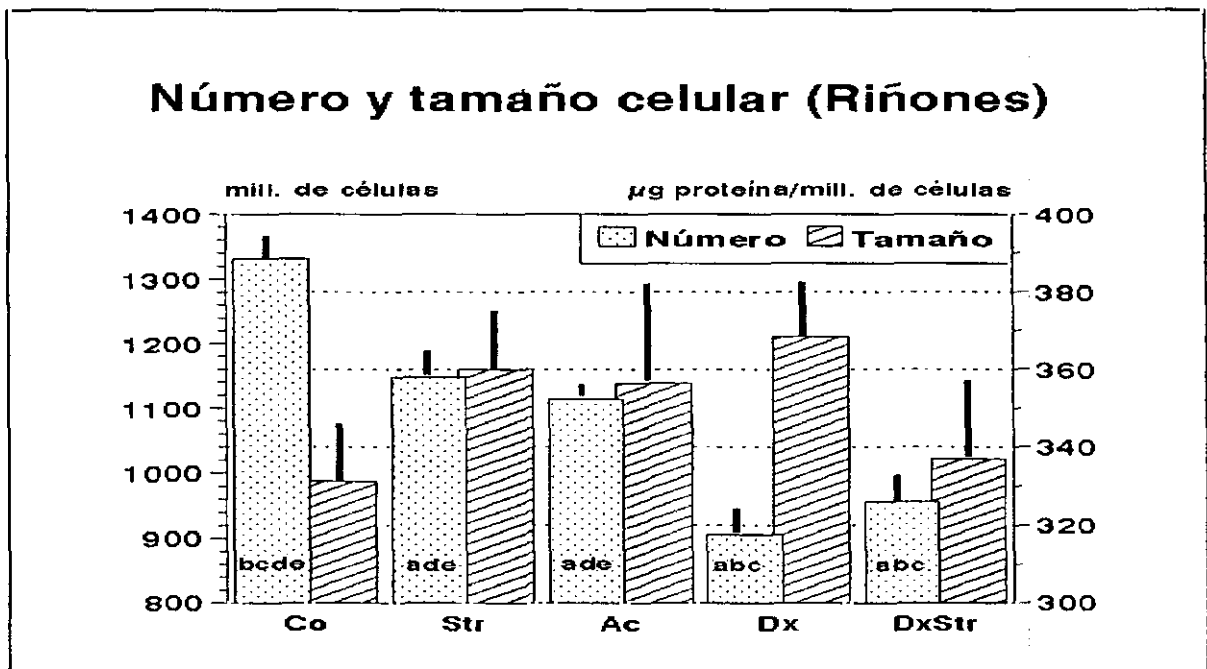


Figura 19: Número y tamaño de las células de los riñones.

Del primer análisis global de estos resultados se desprenden dos conclusiones. Por una parte, se demuestran reducciones generales de los parámetros por todos los tratamientos y, en segundo lugar, que hay un distinto comportamiento de los órganos respecto a tales alteraciones.

Vemos que el encéfalo se diferencia claramente del corazón y del riñón por ser el órgano cuyo crecimiento es más sensible a los tratamientos, hecho que ya fue constatado en la discusión de los resultados de peso de los órganos. Esta sensibilidad es debida, como indican los datos, a que la mayor parte de los tratamientos (a excepción de la administración única de dexametasona) causan una reducción del número de sus células (aplasia) y del tamaño de las mismas (atrofia celular). La confluencia de alteraciones de estos dos parámetros es pues lo que confiere al encéfalo esa mayor sensibilidad respecto al corazón y los riñones, confirmando la reducción del peso o atrofia de este órgano observada en los propios animales estresados. Se explica así también que la administración de dexametasona, al ejercer efecto solamente sobre el número de células, no provoque una reducción del peso del encéfalo en consonancia con su actividad glucocorticoide. De ese modo, aun cuando el peso de este órgano se reduce, no se observan diferencias entre los tratamientos con ACTH y dexametasona, de menor y mayor actividad glucocorticoide respectivamente.

La menor sensibilidad del corazón y del riñón obedece a que, por el contrario, únicamente muestran aplasia. Es decir, a diferencia del encéfalo, el tamaño de sus células no sólo no es sensible a la dexametasona sino que tampoco lo es a la corticosterona ni a una posible acción propia del ruido. Esta menor sensibilidad es coherente con la ausencia de efecto sobre el peso de ambos órganos en el caso de los tratamientos con ruido y ACTH, y explica que sólo cuando esa aplasia celular es suficientemente intensa (administración de dexametasona) se observe una reducción del peso del corazón y de los riñones.

Una vez que hemos señalado la diferente sensibilidad de los órganos a los estímulos capaces de reducir su crecimiento a esta edad de los animales, vamos a continuación a analizar el efecto de cada tratamiento sobre dichos órganos respecto al nivel de activación glucocorticoide que representan. Discutiremos, en primer lugar, los resultados concernientes al encéfalo y, seguidamente, los relativos al corazón y los riñones de forma conjunta por su comportamiento similar en la mayoría de los casos.

Comenzando por el encéfalo de los animales expuestos al ruido, recordemos que nuestros resultados muestran una aplasia del órgano acompañada de atrofia celular, por supuesto de nivel moderado en comparación con los tratamientos de mayor intensidad glucocorticoide.

Las alteraciones encontradas pueden ser causadas por la actividad glucocorticoide consecuente a la hipersecreción de corticosterona provocada por el estrés, pero, en el caso del encéfalo, no se podría descartar que la integración del agente estresante, al ser éste un estímulo sensorial, provoque estas alteraciones directamente sobre las células nerviosas. Una discusión desde estas perspectivas será abordada más adelante cuando resultados relativos a otros tratamientos nos confirmen o no las causas de las alteraciones observadas.

Además, estos resultados nos conducen rápidamente a pensar en la naturaleza de las estirpes celulares afectadas y en las implicaciones neurológicas que pueden tener dichas alteraciones.

Efectivamente, en ningún otro órgano que en el encéfalo, podría sorprendernos encontrar efectos atróficos significativos por todos los tratamientos (incluido el ruido), consecuencia de la afectación tanto del número de células como de su tamaño o maduración. De inmediato surge la pregunta ¿los animales manifestaban disfunciones comportamentales o motoras, consecuencia de un menor número de neuronas?

La respuesta se basa en la observación cotidiana por parte de los investigadores, ya que no se realizaron estudios de dicha naturaleza al no ser objetivo del presente trabajo. Durante dicho contacto diario con los animales no detectamos alteraciones de magnitud suficiente para llamar nuestra atención, y el comportamiento de los animales puede considerarse dentro de la normalidad. Sin embargo, señalamos que podría ser interesante someter estos animales a estudios para comprobar si capacidades neurológicas como las interacciones sociales y sexuales, el comportamiento exploratorio y la capacidad de aprendizaje o memoria, han sido alteradas.

En cualquier caso, la no existencia de problemas neurológicos graves nos lleva a pensar en dos opciones.

La primera de ella nos parece que tiene un sustento menor, se refiere a la posibilidad de que las células afectadas correspondan a otras estirpes celulares distintas a las propias neuronas. Si consideramos que, además de éstas, la población celular más numerosa son las células gliales, podríamos pensar en esta opción. Sin embargo, las disfunciones nerviosas por fallo de la glia son, hoy en día, ampliamente conocidas (Enfermedad de Alzheimer, etc.).

La segunda opción sería pensar que los efectos se ejercen sobre la población neuronal accesoria, y que lo que se desencadena por los tratamientos es un aceleramiento de la mortalidad y una inhibición del crecimiento de dichas neuronas.

Ciertamente, ha sido ampliamente demostrado (**Levi-Montalcini y Calissano, 1979; Kuffler y Nicholls, 1982**) que el nivel de maduración del sistema nervioso al nacimiento, y el nivel máximo conseguido durante la infancia, potencia siempre el crecimiento de un número supletorio de neuronas, no sólo a nivel central sino incluso a nivel periférico (sistema neuromuscular), de manera que se garantice el establecimiento de las conexiones básicas. Con posterioridad, el exceso neuronal conlleva una mortalidad continuada durante toda la vida del sujeto, en principio de las células en excedente, posteriormente de aquellas que intervienen en circuitos no utilizados de acuerdo con la experiencia que va adquiriendo el animal y, por último, y dentro del envejecimiento, se produce la mortalidad de neuronas útiles.

De acuerdo con esta información, nuestros resultados podrían indicar una aceleración de estos procesos durante la exposición a los tratamientos que, considerando el periodo puberal del ciclo biológico de nuestros animales, estaría afectando a población accesoria que quizás nunca hubiese sido utilizada.

Aunque esta hipótesis debería ser confirmada con estudios apropiados, no queremos dejar de exponer la implicación que tendría en individuos de mayor edad relacionar el envejecimiento nervioso con el ruido ambiental.

En cuanto al corazón y el riñón de los animales estresados, vemos que únicamente presentan una moderada aplasia. Los siguientes tratamientos de mayor intensidad

nos confirmarán si esta alteración está causada por los elevados niveles circulantes de corticosterona. Sin embargo, y a diferencia del encéfalo, es obvio que podemos descartar ya una acción directa por la integración nerviosa del estímulo sensorial.

Por otra parte, nosotros no esperábamos encontrar que el crecimiento de estos órganos fuera afectado por el tratamiento con ruido, ya que los datos de peso no mostraban ninguna alteración significativa del mismo. Por lo tanto, estos resultados nos conducen a pensar que la reducción del crecimiento del corazón y del riñón, por implicar únicamente al número de células y además de una forma moderada, queda "diluida" en el conjunto del órgano.

En relación a la aplasia y atrofia celular que presenta el encéfalo de los animales administrados con ACTH, observamos que la superior intensidad de la acción glucocorticoide asociada a dicho tratamiento intensifica frente al estrés tanto una como otra alteración del crecimiento. Estos resultados nos permiten vincular estas alteraciones a los niveles circulantes de corticosterona ya que, al comparar los resultados de ambos tratamientos, se guarda una correlación entre la intensidad del efecto y los niveles plasmáticos de la hormona. Por otra parte, en el tratamiento con ACTH no existe ninguna integración sensorial directa. Quedamos a la espera de los resultados de los siguientes tratamientos.

En relación al corazón y a los riñones, vemos que el efecto aplásico ocasionado por la administración de ACTH supera el debido a la exposición al ruido en el caso del corazón, pero no en el caso del riñón.

De estos resultados se deduce que la mayor acción glucocorticoide de la corticosterona liberada por la administración de ACTH respecto al tratamiento con ruido, no supone diferencias suficientes para intensificar el efecto sobre el riñón. Pero, por otra parte, estos datos podrían indicar una diferente respuesta de ambos órganos a la actividad glucocorticoide. Sin embargo, estos resultados también son coherentes con la sospecha de un efecto cardiotrófico en los animales expuestos al ruido, consecuencia de la activación neurógena por el estrés. Pensemos que si los tratamientos con ruido y ACTH (con diferente actividad glucocorticoide) no consiguen efectos distintos sobre el riñón, lo mismo podría ocurrir sobre el corazón. En ese caso, la atrofia del corazón en los animales estresados hubiese sido similar a la de los tratados con ACTH, pero nosotros encontramos una menor alteración al haber sido

contrarrestada por el referido efecto cardiotrófico. Discutiremos más ampliamente esta hipótesis cuando tengamos reunidos más datos a su favor.

En los animales tratados con dexametasona vimos que, a diferencia de lo que sucedía en el resto de los tratamientos, la aplasia que presenta el encéfalo no se acompaña de atrofia celular. Esta ausencia de efecto por la administración de dexametasona nos conduce a pensar que el crecimiento de las células del encéfalo es sensible a la corticosterona pero no a este glucocorticoide sintético. Esta observación no debe extrañar ya que, en otros parámetros evaluados, también se observarán efectos debidos a la actividad glucocorticoide que no son reproducidos exactamente por la dexametasona.

Por otra parte, el tratamiento con dexametasona no intensifica la aplasia del encéfalo respecto a la provocada por la administración de ACTH, pero sí la del corazón y riñón.

Todos estos resultados nos llevan a considerar que el encéfalo posee una "protección" frente a la dexametasona de la que carece el corazón o el riñón y que no se hace extensiva a la presencia de elevados niveles del glucocorticoide endógeno. Esta protección se traduce en una ausencia total de efecto sobre el tamaño o maduración de las células y en un efecto menor de lo esperado sobre la población total de las mismas. Por consiguiente, el encéfalo "distingue" entre corticosterona y dexametasona lo cual dirige nuestra atención hacia la naturaleza de los receptores que unen corticosteroides en el SNC.

En el encéfalo de la rata se ha detectado la presencia de dos tipos de receptores para corticosteroides, denominados tipo I y II (McEwen y cols., 1969; de Kloet y cols., 1975; Reul y de Kloet, 1985).

Los receptores tipo II, localizados fundamentalmente en el septo lateral, núcleo del tracto solitario e hipocampo, muestran baja afinidad por la corticosterona (de Kloet y cols., 1975). Se ha observado además que el aumento de los niveles circulantes de corticosterona por el estrés provoca la saturación de los mismos (Reul y cols., 1987). Ambos hechos señalan que este receptor tiene como función mediar acciones de la corticosterona en situaciones suprabasales. Estos datos implican a estos receptores como mediadores de las numerosas acciones que se desencadenan en las situaciones de estrés, como por ejemplo en la

autorregulación del eje HHA por los glucocorticoides (**Reul y cols., 1987**). A este respecto, se ha observado en rata que cambios degenerativos asociados a la edad, especialmente en la región del hipotálamo, podrían guardar relación con una pérdida progresiva de sensibilidad del eje HHA a la regulación por feedback negativo. Asimismo parece ser que la pérdida de receptores que unen glucocorticoides en el hipocampo podría estar implicada en dicha desensibilización (**Sapolsky y cols., 1986**). Logicamente, las zonas cerebrales donde se localizan esos receptores poseen conexiones con áreas hipotalámicas. Se ha observado que la sección de las vías aferentes del hipotálamo atenúa los efectos inhibidores que los glucocorticoides ejercen sobre el eje (**Feldman y cols., 1973**).

Ya que estos receptores tipo II, a diferencia de los denominados tipo I, presentan además afinidad por los glucocorticoides sintéticos (**de Kloet y cols., 1975; Raynaud y cols., 1980**) como la dexametasona, nosotros pensamos que la unión de este glucocorticoide a dichos receptores desencadena (a nivel suprahipotalámico) la potente supresión que ejerce sobre el eje HHA, mimetizando así esa acción de la corticosterona.

Pero, por el mismo motivo, podemos sugerir que la unión de la corticosterona a este tipo de receptor no está mediando los efectos por nosotros observados sobre el encéfalo de los animales estresados o tratados con ACTH ya que, si fuera así, también la dexametasona debería haber reproducido dichos efectos.

El otro tipo de receptor (tipo I) presenta, por el contrario, elevada afinidad por la corticosterona (**McEwen y cols., 1969; de Kloet y cols., 1975; Reul y de Kloet, 1985**). Esta característica le permite ser más eficaz que el tipo II a la hora de corregir pequeñas variaciones de los niveles basales de corticosterona, producidas en respuesta a situaciones cotidianas para el animal. Pero, obviamente, también mediará otras muchas acciones de la corticosterona. Nosotros sugerimos que los efectos observados sobre el crecimiento del encéfalo podrían ser ejercidos por la corticosterona vía estos receptores. Esta suposición es coherente con la resistencia que muestra el encéfalo a que su crecimiento resulte afectado por la administración de dexametasona, ya que como hemos mencionado estos receptores no muestran afinidad por la misma.

Sin embargo nada es estricto y así encontramos un efecto, aunque menor, de la dexametasona sobre el número de células del encéfalo. Este efecto sería ejercido a

través de su unión a estos mismos receptores tipo I. Decimos esto porque si el receptor tipo II estuviera implicado deberíamos haber observado, dada su afinidad por la dexametasona, un efecto mucho más acentuado del encontrado, que probablemente llegaría a marcar diferencias significativas frente al tratamiento con ACTH.

Por otra parte, con estos resultados, nada podemos afirmar acerca de cuál es el margen de tolerancia del encéfalo al efecto reductor sobre su crecimiento. Ello obedece a que, como hemos visto, la dexametasona no se comporta sobre ese parámetro exactamente como la corticosterona de modo que, para averiguar dicho margen de tolerancia, necesitaríamos disponer de un tratamiento que ocasionase unos niveles circulantes de corticosterona superiores a los de nuestro tratamiento con ACTH.

Antes de pasar a discutir los resultados del siguiente grupo y aprovechando el contexto en el que nos encontramos, no queremos dejar de mencionar cuál podría ser el motivo por el que no detectamos una resistencia a la acción de la dexametasona en el caso del riñón y del corazón. En este sentido, se han descrito en el riñón de rata dos tipos de receptores que ligan glucocorticoides (**Feldman y cols., 1973; Funder y cols., 1973a,b**). Por un lado, los receptores tipo II con elevada afinidad por estas hormonas y, por otro, el tipo III que es específico para corticosterona. En realidad, de éste último no se conoce con exactitud si es un verdadero receptor o sólo un sitio de unión intracelular. Tampoco su función fisiológica está bien determinada (**Marver, 1984**).

Nosotros proponemos que la unión de la corticosterona a los receptores tipo II del riñón podría estar mediando las alteraciones de crecimiento que observamos. Estos receptores, a diferencia de los tipo III, son capaces de unir dexametasona lo cual explicaría que también encontremos una acción de la dexametasona mimetizando esos efectos de la corticosterona.

Por lo que respecta al corazón, pensamos que los efectos observados podrían estar mediados de una forma similar, si bien carecemos de bibliografía que nos permita apoyar tal suposición.

Los resultados del tratamiento conjunto (administración de dexametasona y ruido) nos señalan dos hechos en relación al encéfalo. Uno de ellos, que la

aplasia del mismo no se acentúa ni frente al tratamiento con ACTH, ni frente al tratamiento único con dexametasona.

El otro hecho es que volvemos a encontrar atrofia de las células del encéfalo. Anteriormente vimos que el tratamiento único con dexametasona no producía efecto sobre el tamaño de las células de este órgano. Por consiguiente, descartada una acción por el glucocorticoide sintético, sólo puede atribuirse esta atrofia celular al otro factor que se adiciona: el ruido. Obsérvese la similitud del nivel de aplasia entre los tratamientos conjunto y de exposición al ruido. Esta acción del ruido en el tratamiento conjunto no es debida a los niveles circulantes de corticosterona que provoca ya que, obviamente, la supresión del eje HHA por la dexametasona mantiene unos niveles del glucocorticoide endógeno por debajo de los valores basales, los cuales por sí solos no ejercen ningún efecto significativo. En consecuencia la acción debe ser provocada directamente por la integración nerviosa del ruido como estímulo sensorial.

De este modo, la aplasia del encéfalo es un efecto debido exclusivamente a la actividad glucocorticoide de la corticosterona y de la dexametasona, mediada por los mismos receptores que, sin embargo, muestran una afinidad distinta por ambos glucocorticoides. Este hecho se traduce en que la dexametasona, a diferencia de la corticosterona, ejerce un efecto cuya magnitud no se corresponde con su actividad glucocorticoide. Por su parte, la atrofia de las células del encéfalo es, a la vista de nuestros resultados, un efecto multifactorial. Por un lado está involucrada una acción por los niveles circulantes de corticosterona, que se vincula a la mediación de los receptores de glucocorticoides antes mencionados pero que no es, en este caso, reproducida de ningún modo por la dexametasona. Por otro lado, nos encontramos con una acción que resulta de la integración sensorial del estímulo y cuyo mecanismo de acción no puede ser hipotetizado. En cualquier caso, estos resultados manifiestan que los procesos de proliferación y maduración de las células de este órgano no son regulados exactamente a través de los mismos mecanismos.

En el caso de los riñones, el tratamiento con dexametasona y exposición al ruido no incrementó la aplasia encontrada en los animales sólo inyectados con dexametasona. Luego, en este caso, la actividad glucocorticoide de la dexametasona provoca un efecto máximo sobre el número total de células de este órgano, que no puede ser intensificado por la adición de la pequeña cantidad de corticosterona circulante producida por el estrés. Algo

esperable si tenemos en cuenta que una cantidad mayor de corticosterona, la liberada por la administración de ACTH, no era capaz de acentuar la aplasia debida al tratamiento estresante.

El corazón de los animales expuestos a dexametasona y ruido sí mostró diferencias significativas comparado con el de los sólo tratados con dexametasona. Sin embargo, estas diferencias no señalan un aumento de la aplasia sino que, por el contrario, el corazón de estos animales tiene un mayor número total de células.

Estos resultados reproducen exactamente lo ocurrido cuando comparamos el peso del corazón de los animales de estos tratamientos, y confirman que los efectos atróficos, por aplasia del corazón, debidos a la acción glucocorticoide de la dexametasona, son contrarrestados significativamente por la exposición al ruido en el tratamiento conjunto. Por consiguiente, la hipótesis acerca de la existencia de un cierto efecto cardiotrófico, consecuencia del ruido en los animales tratados con dexametasona, queda confirmada a la luz de estos resultados.

Desde una perspectiva fisiológica, esta hipótesis tenía altas probabilidades de ser cierta, ya que un efecto cardiotrófico puede ser la consecuencia crónica de la activación neurógena desplegada en la exposición a cualquier estímulo estresante.

Efectivamente, si recordamos lo expuesto en la Introducción, la respuesta fisiológica al estrés desencadena inicialmente una respuesta rápida (Reacción de Alarma) mediada por terminales simpáticos y médula adrenal, y que precede a la activación del eje HHA. Precisamente un blanco importante de tal respuesta es el sistema cardiovascular.

En las situaciones de estrés agudo esta respuesta, que recupera los niveles basales con notable rapidez, no es capaz de provocar alteraciones morfométricas de un órgano. Sin embargo, en situaciones crónicas, por mantenimiento o repetición de las exposiciones, tales alteraciones entran en el terreno de la posibilidad a expensas de la duración y/o intensidad del estrés. Es evidente que en nuestro caso, la repetición 15 minutos diarios de sesiones de ruido (102 dB) durante 30 días consiguen tales efectos crónicos.

Obviamente, este efecto cardiotrófico del estrés está ocurriendo en todos los animales expuestos al ruido, estén o no tratados con dexametasona, pero no puede

detectarse claramente en los expuestos sólo al ruido por quedar enmascarado por los efectos aplásicos encontrados. Ello contesta el interrogante acerca de este hecho planteado en el apartado de los pesos de los órganos.

Por lo tanto, es presumible que la reducción mediada por la actividad glucocorticoide del número de células del corazón en los animales estresados sería mayor de lo observado en ausencia del efecto cardiotrófico, mediado por el componente neurógeno del estrés. Por su parte, en los animales tratados con ACTH, la aplasia cardíaca parece aumentar respecto al estrés porque en ellos no hay ningún efecto cardiotrófico que la mitige y que permita que los efectos aplásicos causados por ambos tratamientos se igualen, como si sucede en el riñón.

Todo lo expuesto concuerda con el hecho de que los animales de estos tratamientos muestran diferentes grados de hipertensión crónica (**Alario y cols., 1987a; Gamallo y cols., 1988**), que en el caso del estrés resultó ser multifactorial (**Alario, 1991**). El presente trabajo permite añadir que aunque la moderada hipertrofia cardíaca podría ser considerada en los animales estresados como un factor hipertensivo más, es sin embargo contrarrestada por el efecto aplásico de los glucocorticoides.

Por otra parte, estos resultados nos aportan interesantes consideraciones sobre la homeostasis de la respuesta al estrés.

Efectivamente, ante situaciones de estrés ambiental más o menos frecuentes en la vida cotidiana de un sujeto, nos encontramos respuestas que persiguen, mediante distintos mecanismos, objetivos claramente adaptativos. Nos referimos a la activación neurógena por un lado, y a la respuesta corticoadrenal por otro. En niveles moderados de ambas respuestas, el efecto cardiotrófico de la activación neurógena puede, sin que sea su objetivo directo, mantener la función cardíaca comprometida por la aplasia del corazón debida a los glucocorticoides. Este equilibrio también se entiende en sentido contrario y obviamente es una consecuencia secundaria de ambos mecanismos. Es razonable pensar que cuando la situación estresante crónica excede los límites de lo permisivo, el equilibrio se romperá a favor de los efectos mediados por los glucocorticoides.

Tratando de aunar todo lo hasta ahora discutido en relación a estos

resultados, podemos concluir, en primer lugar, que los órganos evaluados no se encuentran en el mismo estadio de desarrollo, caracterizándose el encéfalo por presentar, a esta edad de los animales, un desarrollo menos estabilizado que el del corazón o riñón. Esta diferencia responde a que tanto la proliferación como la maduración celular son procesos activos en el caso del encéfalo, mientras que sólo el primero de ellos está determinando el crecimiento de los otros dos órganos.

En segundo lugar, concluimos que el desarrollo de estos órganos reproduce la correlación mostrada por parámetros anteriores entre la intensidad de las alteraciones y de los tratamientos. Conviene matizar, sin embargo, que en los órganos cuyo crecimiento no se encuentra aún estabilizado, la correlación se hace patente de una forma significativa en el peso del órgano. Por el contrario, cuando el crecimiento del órgano ha alcanzado un cierto grado de estabilidad, se dificulta que las alteraciones de crecimiento se manifiesten en el peso y así la correlación a este nivel se pierde.

Por último, queremos destacar la existencia de una serie de peculiaridades de estos órganos que rompen puntualmente esa correlación de la que hablamos. Nos referimos, por un lado, a la resistencia que muestra el crecimiento del encéfalo frente a la acción de la dexametasona y, por otro, al efecto cardiotrófico del estrés.

En resumen, el conjunto de todos estos resultados responden a los Objetivos 2a y 2b al mostrar un papel de los glucocorticoides sobre el crecimiento a nivel de los tejidos, así como la existencia de respuestas específicas de cada uno de los tres órganos a los estímulos que alteran su crecimiento. A su vez, estos datos son coherentes con las alteraciones que los animales presentan en sus dimensiones corporales y verifican la incidencia de todos estos efectos en el peso corporal de los mismos.

Si nos centramos en el crecimiento del individuo, vemos por todo lo dicho que éste no es un proceso con un carácter exclusivamente global, sino la resultante de la contribución al mismo del crecimiento de cada uno de los constituyentes del animal. Esta contribución además no es homogénea, pues del mismo modo que esos constituyentes son entidades con características propias y diferentes entre sí, también lo es su patrón de crecimiento (recordemos la distinta respuesta visceral a la diferente intensidad de acción glucocorticoide de nuestros tratamientos).

En este contexto es indudable la contribución que el esqueleto hace al crecimiento del animal, ya que su desarrollo y dimensiones están estrechamente relacionados con las dimensiones corporales del individuo. Consecuentemente, resulta interesante para este trabajo conocer si las alteraciones en el crecimiento asociadas a situaciones de elevada intensidad de acción glucocorticoide, y halladas en nuestros animales, son reflejo de un posible efecto reductor sobre el crecimiento de su esqueleto. Esta es la cuestión que plantea nuestra Hipótesis 3, la cual desglosamos, como en otras ocasiones, en hipótesis parciales y sus correspondientes objetivos.

4. CRANEOMETRIA

Abordar la cuestión anteriormente planteada precisa de un estudio dimensional que nosotros centramos en el cráneo de nuestros animales atendiendo a las razones aducidas en el Objetivo General referente al esqueleto. Este estudio nos permitirá no sólo conocer si el cráneo muestra un menor tamaño, sino también si las variables craneométricas responden de manera diferente a la distinta intensidad de la acción glucocorticoide representada por nuestros tratamientos verificando, de ese modo, posibles cambios morfológicos. Observamos así que unos resultados constituyen el punto de partida de otros, siendo esta concatenación de datos el motivo por el que vamos a englobar a continuación en un mismo apartado los resultados concernientes a las variables e índices craneométricos, facilitándonos con ello su discusión y permitiéndonos responder a los Objetivos 3a y 3b conjuntamente.

4.1. VARIABLES CRANEOMETRICAS E INDICES: ESTUDIO UNIVARIANTE

Los valores correspondientes a las variables craneométricas evaluadas se muestran en la Tabla 13, expresados como medias aritméticas (m) y desviaciones estándar (ds), mientras que el resultado del estudio estadístico de estos valores se muestra en la Tabla 14.

DIMENSIONES CRANEALES					
Grupos experimentales					
Variables	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
A-B	45.56± 0.72	45.39± 0.92	44.11± 0.81*	43.19± 0.50†	42.38± 0.59^
B-E	16.38± 0.55	16.66 ± 0.53	16.22 ± 0.48	15.61 ± 0.33	15.12 ± 0.29^
G-I	6.63 ± 0.43	6.69 ± 0.33	7.02 ± 0.34	6.91 ± 0.43	6.54 ± 0.41
3-12	37.80 ± 0.58	38.07 ± 0.70	36.20 ± 0.57*	35.58 ± 0.73	35.16 ± 0.56
11-12	21.78 ± 0.35	22.02 ± 0.50	21.25 ± 0.38*	20.75 ± 0.33†	20.46 ± 0.31
3-4	6.50 ± 0.14	6.59 ± 0.22	6.00 ± 0.11*	5.88 ± 0.21	5.98 ± 0.22
4-5	14.63 ± 0.39	14.63 ± 0.45	13.86 ± 0.31*	13.89 ± 0.44	13.57 ± 0.22
5-6	19.53 ± 0.17	19.66 ± 0.37	19.17 ± 0.38*	18.50 ± 0.27†	18.26 ± 0.41
10-12	40.54 ± 0.58	41.12 ± 0.75	39.22 ± 0.65*	38.78 ± 0.83†	38.17 ± 0.59^
K-M	15.54 ± 0.21	15.37 ± 0.30	15.10 ± 0.24*	14.48 ± 0.26†	14.20 ± 0.22^
K-R	34.20 ± 0.66	34.11 ± 0.65	32.84 ± 0.61*	32.29 ± 0.63†	31.69 ± 0.46^
E-I	14.75 ± 0.48	14.99 ± 0.33	14.28 ± 0.40*	13.86 ± 0.24†	13.35 ± 0.39^
C-I	19.57 ± 0.48	19.66 ± 0.54	19.07 ± 0.35*	18.57 ± 0.32†	18.00 ± 0.49^
C-F	17.28 ± 0.55	17.15 ± 0.31	16.32 ± 0.78*	16.18 ± 0.57	16.18 ± 0.34
D-J	18.53 ± 0.81	18.33 ± 0.90	18.46 ± 0.46	17.69 ± 0.72	17.35 ± 0.52
D-E	19.15 ± 0.44	18.97 ± 0.62	18.44 ± 0.36*	18.16 ± 0.49	17.98 ± 0.48
1-2	5.64 ± 0.30	5.65 ± 0.18	5.37 ± 0.25*	5.38 ± 0.21	5.30 ± 0.17
2-3	5.56 ± 0.10	5.46 ± 0.14	5.38 ± 0.12	5.69 ± 0.42	5.49 ± 0.12
7-7'	23.42 ± 0.44	23.33 ± 0.42	21.76 ± 0.51*	21.97 ± 0.95	21.79 ± 0.45
8-8'	16.28 ± 0.39	16.28 ± 0.29	15.69 ± 0.30*	15.70 ± 0.36	15.67 ± 0.25
9-9'	6.61 ± 0.31	6.84 ± 0.20	6.52 ± 0.14	6.70 ± 0.20	6.60 ± 0.18
neuro	29.19 ± 0.77	28.73 ± 0.56	27.89 ± 0.44*	27.58 ± 0.36	27.26 ± 0.47
5-12	16.66 ± 0.34	16.85 ± 0.23	16.34 ± 0.32*	15.80 ± 0.37†	15.71 ± 0.34

Tabla 13: Dimensiones craneales (mm).
Los datos indican la media ± desviación estándar.

COMPARACIONES EMPAREJADAS (Test de Fisher)							
Variables craneométricas	ANOVA F (4,41)	Significación	Grupos experimentales				
			Co	Str	Ac	Dx	DxStr
A-B	32.90	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abce	abcd
B-E	18.55	$p \leq 0.001$	de	cde	bde	abce	abcd
G-I	2.83	$p \leq 0.05$	c	e	ae	e	bcd
3-12	6.54	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
11-12	27.94	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abc	abc
3-4	28.12	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
4-5	15.88	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
5-6	31.23	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abc	abc
10-12	57.54	$p \leq 0.001$	bcde	acde	abde	abce	abcd
K-M	99.09	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abce	abcd
K-R	62.33	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abce	abcd
E-I	58.13	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abce	abcd
C-I	44.17	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abce	abcd
C-F	18.52	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
D-J	10.59	$p \leq 0.001$	de	de	de	abc	abc
D-E	18.02	$p \leq 0.001$	cde	cde	abe	ab	abc
1-2	4.82	$p \leq 0.01$	cde	cde	ab	ab	ab
2-3	2.70	$p \leq 0.05$	ns	d	d	bce	d
7-7'	18.53	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
8-8'	9.48	$p \leq 0.01$	cde	cde	ab	ab	ab
9-9'	3.30	$p \leq 0.05$	ns	ce	b	ns	b
neuro	20.59	$p \leq 0.001$	cde	cde	ab	ab	ab
5-12	22.61	$p \leq 0.001$	cde	cde	abde	abc	ab

Tabla 14: Evaluación estadística de los resultados de las variables craneométricas.

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo de la columna considerada y los diferentes grupos experimentales, teniendo en cuenta que a = Co, b = Str, c = Ac, d = Dx y e = DxStr.

El tratamiento con estrés sonoro causó en los cráneos de los animales la modificación significativa de una de las variables craneométricas en estudio definida como **10-12**, la cual incrementa su valor frente al grupo control ($p \leq 0.05$). La administración de ACTH provocó frente al grupo Co y Str una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de dieciocho variables craneométricas las cuales aparecen señaladas en la Tabla 13 con el símbolo *. Las variables **B-E** ($p \leq 0.05$) y **9-9'** ($p \leq 0.01$) también se redujeron significativamente frente al grupo Str. La variable **G-1** mostró frente al grupo Co un aumento significativo ($p \leq 0.05$).

El grupo Dx presenta una reducción significativa de todas las variables ($p \leq 0.05$ vs Co y Str), excepto **G-1**, **2-3** y **9-9'**. Frente al grupo Ac, nueve de estas variables experimentan una reducción más acentuada ($p \leq 0.05$), son aquellas indicadas en la Tabla 13 con el símbolo †. El tratamiento conjunto de exposición a estrés sonoro y de administración de dexametasona afectó a todas las variables, reduciendo su valor frente al grupo Co ($p \leq 0.05$) excepto **G-1**, **2-3** y **9-9'**; y frente al grupo Str ($p \leq 0.05$) excepto **2-3**. El valor de dicha reducción fue mucho mayor que el causado por la administración de Dx en siete variables que se señalan en la Tabla 13 con el símbolo ^.

Los valores de los índices craneométricos definidos, expresados como medias aritméticas (m) y desviaciones estándar (ds), y el resultado de su evaluación estadística se muestran en las Tablas 15 y 16, respectivamente.

La estimulación sonora causó la modificación significativa del índice **L-interior**, cuya magnitud aumenta respecto al grupo control ($p \leq 0.05$).

La administración de ACTH alteró frente a los controles dieciseis índices ($p \leq 0.05$), de los cuales diez muestran un aumento significativo y aparecen en la Tabla 15 con el símbolo Δ , mientras que los seis restantes, indicados con el símbolo *, disminuyen. De estos dieciseis índices, nueve de ellos también difieren significativamente frente al grupo Str ($p \leq 0.05$): **T-palatin**, **T-maxilar**, **T-diastem**, **T-prepala**, **L-palatin**, **L-maxilar**, **I-basiocc**, **I-cigobre** e **I-bicigom**.

En los animales administrados con dexametasona se observa que trece índices presentan una modificación significativa respecto a los animales controles ($p \leq 0.05$). Ocho de ellos aumentan su magnitud y los cinco restantes muestran una modificación en

sentido contrario. Estos índices se señalan en la Tabla 15 con los símbolos # y ^, respectivamente. De estos trece índices, cinco de ellos: **L-supraoc**, **T-cigobre**, **T-craneof**, **I-supraoc** e **I-basiocc** también son alterados por la administración de ACTH, aunque no existen para ellos diferencias entre ambos tratamientos.

El tratamiento conjunto de exposición a estrés sonoro y de administración de dexametasona alteró de forma significativa nueve índices ($p \leq 0.05$), de los cuales cinco muestran un aumento de su valor y se indican con el símbolo Δ en la Tabla 15, mientras que los cuatro restantes se reducen y aparecen señalados en la misma tabla con el símbolo ϕ . A excepción de los índices L-cefalic e I-cefalic, el resto también son modificados significativamente por la administración única de dexametasona, si bien ambos tratamientos experimentales no difieren entre sí para ellos.

INDICES CRANEOMETRICOS					
Grupos experimentales					
Indices	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
L-basiocc	22.28 \pm 0.66	22.95 \pm 0.56	21.53 \pm 0.47	21.33 \pm 0.74	21.93 \pm 0.71
L-bicigom	80.29 \pm 2.37	80.91 \pm 1.06	78.00 \pm 1.23	79.08 \pm 2.12	79.95 \pm 1.78
L-cefalic	55.78 \pm 0.83	56.73 \pm 1.36	56.24 \pm 0.49	56.92 \pm 1.07	57.50 \pm 1.05 Δ
L-cigobre	59.22 \pm 1.12	59.71 \pm 1.14	57.90 \pm 1.02	58.66 \pm 1.50	59.38 \pm 1.14
L-cigoint	67.10 \pm 2.22	68.43 \pm 1.07	68.38 \pm 0.98	67.34 \pm 0.51	65.75 \pm 1.51
L-diastem	71.35 \pm 1.20	69.86 \pm 1.31	71.06 \pm 0.71	69.78 \pm 0.73 $^{\wedge}$	69.35 \pm 0.90 ϕ
L-esfenop	50.14 \pm 0.83	50.90 \pm 0.86	49.68 \pm 0.74	50.38 \pm 1.30	49.79 \pm 0.97
L-exoccip	19.33 \pm 0.82	19.68 \pm 0.86	19.27 \pm 1.00	19.50 \pm 0.81	19.46 \pm 0.55
L-foramen	19.04 \pm 0.51	19.00 \pm 0.59	19.34 \pm 0.64	20.61 \pm 1.33 $\#$	20.14 \pm 0.49

Tabla 15: Índices craneométricos.

Los datos indican la media \pm desviación estándar.

INDICES CRANEOMETRICOS					
Grupos experimentales					
Indices	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
L-interor	22.64 ± 0.70	23.82 ± 0.36	23.39 ± 0.58	24.30 ± 0.58#	24.21 ± 0.51Δ
L-maxilar	51.67 ± 0.55	51.65 ± 0.76	52.96 ± 0.48Δ	52.01 ± 0.70	51.93 ± 0.65
L-nasal	56.17 ± 2.87	57.99 ± 1.74	58.14 ± 1.40	56.60 ± 1.36	55.48 ± 1.31
L-nasoint	50.59 ± 2.24	52.19 ± 1.01	51.22 ± 1.15	50.27 ± 0.84	49.00 ± 1.65
L-palatin	57.65 ± 0.87	57.83 ± 0.73	58.71 ± 0.32Δ	58.33 ± 0.46	58.23 ± 0.43
L-prepala	44.09 ± 0.69	44.28 ± 0.66	45.13 ± 0.44	44.42 ± 0.91	44.40 ± 0.87
L-supraoc	22.71 ± 1.21	24.21 ± 0.88	25.16 ± 1.24Δ	25.09 ± 1.83#	23.99 ± 1.41
L-yugoint	63.56 ± 3.56	63.78 ± 1.95	66.11 ± 1.08	64.13 ± 1.93	63.64 ± 0.86
L-yugonas	65.66 ± 1.80	66.02 ± 1.11	66.17 ± 0.71	65.79 ± 0.98	65.97 ± 0.80
T-basiocc	39.95 ± 1.01	40.47 ± 1.36	38.28 ± 0.87	37.47 ± 1.03^	38.14 ± 1.38ϕ
T-cigobas	61.97 ± 0.77	61.06 ± 0.89	60.10 ± 0.99*	61.30 ± 1.43	61.99 ± 1.31
T-cigobre	106.18 ± 1.62	105.28 ± 2.08	102.94 ± 1.69*	103.07 ± 2.29^	103.27 ± 1.66ϕ
T-craneof	143.94 ± 3.63	142.65 ± 1.87	138.69 ± 2.71*	138.94 ± 2.93^	139.06 ± 2.68ϕ
T-diastem	66.38 ± 1.09	66.16 ± 1.09	69.43 ± 1.18Δ	66.42 ± 1.69	65.17 ± 1.49
T-exoccip	34.66 ± 1.74	34.68 ± 1.40	34.26 ± 1.81	34.28 ± 1.83	33.84 ± 1.00
T-foramen	34.14 ± 0.65	33.50 ± 0.52	34.39 ± 1.26	36.20 ± 1.95#	35.02 ± 0.78
T-interor	40.61 ± 1.65	42.00 ± 1.06	41.59 ± 1.18	42.68 ± 0.60#	42.10 ± 0.84
T-maxilar	83.39 ± 1.13	84.59 ± 1.14	88.13 ± 1.42Δ	84.90 ± 2.78	83.81 ± 2.21

Tabla 15 (Continuación): Indices craneométricos.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

INDICES CRANEOMETRICOS					
Grupos experimentales					
Indices	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
T-nasocig	69.93 ± 2.07	71.69 ± 2.53	74.55 ± 1.70Δ	71.62 ± 2.62	69.41 ± 1.56
T-palatin	93.04 ± 1.05	94.71 ± 1.21	97.71 ± 1.82Δ	95.20 ± 2.67	93.99 ± 2.33
T-prepala	71.16 ± 0.98	72.52 ± 1.09	75.10 ± 0.93Δ	72.50 ± 2.23	71.66 ± 2.32
T-supraoc	40.73 ± 2.41	42.69 ± 1.93	44.75 ± 2.42Δ	44.10 ± 3.56	41.72 ± 2.27
T-yugonas	117.73 ± 3.09	116.43 ± 3.62	117.66 ± 1.75	115.59 ± 1.76	114.77 ± 2.51
I-basiocc	14.27 ± 0.30	14.53 ± 0.28	13.61 ± 0.24*	13.62 ± 0.39^	14.10 ± 0.46
I-bicigom	51.41 ± 0.84	51.22 ± 0.98	49.32 ± 0.72*	50.50 ± 1.45	51.42 ± 0.99
I-cefalic	35.72 ± 0.41	35.91 ± 0.97	35.57 ± 0.40	36.35 ± 0.56	36.98 ± 0.53Δ
I-cigobre	37.93 ± 0.70	37.80 ± 0.50	36.61 ± 0.44*	37.46 ± 0.97	38.19 ± 0.57
I-cigoint	42.97 ± 1.05	43.32 ± 0.69	43.24 ± 0.70	43.00 ± 0.40	42.29 ± 0.86
I-esfenop	32.11 ± 0.39	32.22 ± 0.63	31.42 ± 0.56	32.17 ± 0.76	32.02 ± 0.52
I-exoccip	12.38 ± 0.65	12.46 ± 0.56	12.19 ± 0.72	12.46 ± 0.58	12.51 ± 0.34
I-foramen	12.19 ± 0.16	12.03 ± 0.37	12.23 ± 0.42	13.16 ± 0.83#	12.95 ± 0.33Δ
I-interor	14.51 ± 0.65	15.08 ± 0.26	14.79 ± 0.33	15.51 ± 0.32#	15.57 ± 0.31Δ
I-nasal	35.95 ± 1.19	36.70 ± 0.69	36.76 ± 0.56	36.14 ± 0.56	35.68 ± 0.55
I-nasoint	32.38 ± 0.93	33.03 ± 0.49	32.39 ± 0.64	32.10 ± 0.35	31.51 ± 0.87
I-supraoc	14.55 ± 0.93	15.32 ± 0.53	15.91 ± 0.77Δ	16.02 ± 1.15#	15.43 ± 0.85
I-total	64.05 ± 1.19	63.30 ± 0.69	63.24 ± 0.56	63.86 ± 0.56	64.32 ± 0.55
I-yugoint	40.68 ± 1.73	40.37 ± 1.24	41.81 ± 0.72	40.95 ± 1.18	40.93 ± 0.80
I-yugonas	42.05 ± 0.79	41.79 ± 0.64	41.85 ± 0.65	42.01 ± 0.64	42.44 ± 0.77

Tabla 15 (Continuación): Índices craneométricos.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

ANOVA Y COMPARACIONES EMPAREJADAS (Test de Scheffe)							
Indices craneométricos	Anova F(4,41)	Significación	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
L-basiocc	9.40	$p \leq 0.001$	ns	cde	b	b	b
L-bicigom	3.94	$p \leq 0.01$	ns	c	b	ns	ns
L-cefalic	3.94	$p \leq 0.01$	e	ns	ns	ns	a
L-cigobre	3.45	$p \leq 0.05$	ns	c	b	ns	ns
L-cigoint	6.43	$p \leq 0.001$	ns	e	e	ns	bc
L-diastem	7.13	$p \leq 0.001$	de	ns	e	a	ac
L-esfenop	2.43	ns	ns	ns	ns	ns	ns
L-exoccip	0.35	ns	ns	ns	ns	ns	ns
L-foramen	7.66	$p \leq 0.001$	d	d	d	abc	ns
L-interor	12.87	$p \leq 0.001$	bde	a	de	ac	ac
L-maxilar	6.83	$p \leq 0.001$	c	c	abde	c	c
L-nasal	4.07	$p \leq 0.01$	ns	ns	e	ns	c
L-nasoint	6.37	$p \leq 0.001$	ns	e	e	ns	bc
L-palatin	4.76	$p \leq 0.01$	c	c	ab	ns	ns
L-prepala	2.77	ns	ns	ns	ns	ns	ns
L-supraoc	4.67	$p \leq 0.01$	cd	ns	a	a	ns
L-yugoint	2.73	ns	ns	ns	ns	ns	ns
L-yugonas	0.29	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T-basiocc	9.40	$p \leq 0.001$	de	cde	b	ab	ab
T-cigobas	4.63	$p \leq 0.01$	c	ns	ae	ns	c
T-cigobre	5.43	$p \leq 0.01$	cde	ns	a	a	a
T-craneof	6.80	$p \leq 0.001$	cde	ns	a	a	a

Tabla 16: Evaluación estadística de los resultados de los índices.

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo de la columna considerada y los diferentes grupos experimentales, teniendo en cuenta que a= Co, b= Str, c= Ac, d= Dx y e= DxStr.

ANOVA Y COMPARACIONES EMPAREJADAS (Test de Scheffe)							
Indices craneométricos	Anova F(4,41)	Significación	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
T-diastem	14.26	$p \leq 0.001$	c	c	abde	c	c
T-exoccip	0.45	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T-foramen	7.00	$p \leq 0.001$	d	d	d	abc	ns
T-interor	4.12	$p \leq 0.01$	d	ns	ns	a	ns
T-maxilar	9.66	$p \leq 0.001$	c	c	abde	c	c
T-nasocig	8.76	$p \leq 0.001$	c	ns	ae	ns	c
T-palatin	7.66	$p \leq 0.001$	c	c	abe	ns	c
T-prepala	8.05	$p \leq 0.001$	c	c	abde	c	c
T-supraoc	3.76	$p \leq 0.05$	c	ns	a	ns	ns
T-yugonas	2.29	ns	ns	ns	ns	ns	ns
I-basiocc	12.44	$p \leq 0.001$	cd	cd	ab	ab	ns
I-bicigom	7.39	$p \leq 0.001$	c	c	abe	ns	c
I-cefalic	8.53	$p \leq 0.001$	e	e	e	ns	c
I-cigobre	8.55	$p \leq 0.001$	c	c	abe	ns	c
I-cigoint	2.76	$p \leq 0.05$	ns	ns	ns	ns	ns
I-esfenop	3.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns
I-exoccip	0.47	ns	ns	ns	ns	ns	ns
I-foramen	10.29	$p \leq 0.001$	de	de	de	abc	abc
I-interor	12.59	$p \leq 0.001$	de	ns	de	ac	ac
I-nasal	4.03	$p \leq 0.01$	ns	ns	e	ns	c
I-nasoint	6.07	$p \leq 0.001$	ns	e	ns	ns	b
I-supraoc	3.87	$p \leq 0.01$	cd	ns	a	a	ns
I-total	4.03	$p \leq 0.01$	ns	e	ns	ns	b
I-yugoint	2.03	ns	ns	ns	ns	ns	ns
I-yugonas	1.29	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 16 (Continuación): Evaluación estadística de los resultados de los índices.

Vamos a comenzar por analizar el efecto de la exposición crónica al ruido sobre la craneometría, para ello procedemos a agrupar las 23 variables craneométricas estudiadas atendiendo al criterio de un aumento o reducción de sus valores, aun cuando no se alcance la significación estadística. En los animales estresados, nueve de las variables muestran una reducción frente a once que, por el contrario, aumentan. Sobre las tres restantes no observamos una modificación de su magnitud en uno u otro sentido.

Nosotros esperábamos hallar una alteración del crecimiento que se manifestase sobre las variables craneométricas reduciendo su valor. El hecho por el cual esta reducción no alcanzase en los animales expuestos al ruido significación estadística no resultaría sorprendente teniendo en cuenta la edad de nuestras ratas y la moderada intensidad del modelo estresante utilizado. Ambas circunstancias hacen que los efectos del tratamiento sobre el crecimiento del animal sean muy leves pudiendo quedar en ocasiones enmascarados, hecho éste que ya ha sido constatado en los resultados hasta aquí analizados relativos a otros parámetros. Sin embargo, encontrar un grupo de variables con una tendencia a incrementar sus valores, e incluso una de ellas donde esta tendencia se hace significativa, nos obliga a una atenta reflexión. Lo más inmediato será fijar nuestra atención precisamente en la variable cuyo aumento alcanza la significación estadística, dicha variable representa la longitud cóndilo-basal (10-12).

Vamos a continuación a discutir las razones que explicarían el aumento significativo de la longitud cóndilo-basal (10-12). Esta variable, a diferencia de la longitud basal (3-12) definida en el plano sagital, se halla ligeramente desplazada de este plano por incluir a los cóndilos occipitales. Sin embargo, en ambos casos se representa la práctica totalidad de la longitud del cráneo correspondiente a su región ventral. Dado que, precisamente la variable que muestra un aumento significativo es aquella que en su definición incluye a los cóndilos occipitales, podríamos pensar que estos fueran los responsables de dicho aumento significativo. Para confirmar esta proposición definimos dos nuevas variables: **separación bicondílea** y **profundidad condílea** que fueron medidas a continuación sólo en los animales control y estresados, observándose que la magnitud de ambas aumenta en los individuos expuestos al ruido (resultados que aparecen reflejados en la Tabla 17).

VARIABLES CONDILEAS (mm)		
	Co	Str
Profundidad condílea	2.43 ± 0.10 b	2.64 ± 0.11 a
Separación condílea	9.66 ± 0.08 b	10.01 ± 0.26 a
Profundidad condílea	Grupo experimental F (1,15) = 16.35 p ≤ 0.01	
Separación condílea	Grupo experimental F (1,15) = 13.52 p ≤ 0.01	

Tabla 17: Variables condíleas (mm).

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los superíndices representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a= Co y b= Str.

Este mayor desarrollo de los cóndilos occipitales podría obedecer a un reforzamiento de dicha región, contribuyendo también a ello tanto el desarrollo de las crestas occipitales, como pone en evidencia el aumento, si bien no significativo, de la longitud supraoccipital (G-1), como el incremento observado en la longitud basioccipital (3-4). Estas dos variables representan respectivamente la dimensión longitudinal de los huesos supra y basioccipital, éste último limitando al *foramen magnum* por su parte ventral y ambos formando parte del complejo occipital, punto de inserción de importantes músculos nucales y cervicales.

Un efecto de reforzamiento de cualquier zona ósea debe ser consecuencia, en principio, de un proceso de remodelación y, por consiguiente, estas alteraciones no pueden ser analizadas desde el punto de vista de las posibles acciones de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento. Tampoco parece probable que una remodelación tan específica sea consecuencia de una acción generalizada de los glucocorticoides y, por el contrario, si causada por algún factor específico contenido en la exposición al ruido que, de ser necesario, analizaremos posteriormente. Además, esta suposición deberá ser confirmada a la vista de los resultados obtenidos en los restantes tratamientos.

Por lo tanto, tres de las variables craneométricas que mostraron valores mayores en las ratas expuestas al ruido que en los controles (longitudes basal, supraoccipital y basioccipital) están relacionadas con el aumento significativo de la longitud cóndilo-basal y con

un posible reforzamiento del complejo occipital y, aunque quizá no fuese necesario, queremos hacer una reflexión en relación con las siete variables restantes no relacionadas con dicho complejo pero que se comportan del mismo modo.

En realidad este número de siete queda reducido considerablemente ya que algunas de ellas son medidas parciales que se integran o participan en otras contribuyendo a su dimensión total. Cualquier variación en la medida de las variables parciales es nuevamente registrada en la variable que las contiene o suma. Así ocurre por separado con la longitud palatina (11-12) o con la anteriormente mencionada longitud basal (3-12) del cráneo. Esta última engloba tres longitudes individuales: la prepalatina (5-12), la basioccipital (3-4) y la basisfenopalatina (4-5), de las cuales la última no sufre alteración en ningún sentido. Es evidente, por lo tanto, que el aumento de magnitud de la longitud basal es consecuencia de los aumentos individuales de las longitudes prepalatina y basioccipital, considerando además que ésta última ha sido ya discutida entre aquellas que formaban parte del complejo occipital, del cual conocemos que parece mostrar un reforzamiento óseo.

En relación con la longitud palatina (11-12), ocurre algo similar ya que es la suma parcial de las ya referidas longitudes prepalatina y basisfenopalatina, de las que sólo la primera muestra tendencia al aumento de su magnitud.

Por lo tanto, tres de las siete variables no relacionadas con el complejo occipital, pero cuya magnitud aumentaba, podrían quedar exclusivamente representadas por una de ellas, la longitud palatina, cuya tendencia a aumentar queda reflejada en las otras dos.

Nos quedan otras cinco variables, longitud cigointermaxilar (C-I), longitud nasal (B-E), longitud intermaxilonasal máxima (E-I), longitud maxilar (5-6) y anchura interorbitaria (9-9'), que también manifiestan un aumento no significativo. Con el fin de facilitar la discusión vamos a centrarnos en este momento en el análisis de las cuatro primeras, mientras que la última la trataremos más adelante. Como podemos observar son variables, todas ellas, relacionadas con la región nasal mientras que aquellas anteriormente mencionadas, y contenidas en las longitudes basal y palatina, son asociables en términos generales a la región del paladar de acuerdo con lo previamente descrito. Por supuesto que una alteración no significativa carece de peso suficiente para determinar un efecto pero, además, en este caso, queremos señalar que la posibilidad de que las variables aumenten se aleja del planteamiento

razonable de los posibles efectos esperados en este estudio. Sin embargo, habrá que esperar a los resultados obtenidos al intensificar la acción glucocorticoide en los restantes tratamientos para elaborar una hipótesis respecto a una variación dimensional de la zona naso-palatina. Distinto es el caso del efecto de reforzamiento del complejo occipital donde al menos una de las variables relacionadas aumenta significativamente y todas las restantes aumentan aunque sin alcanzar significación estadística, apoyándose este efecto por el aumento encontrado en las dos variables relacionadas con los cóndilos occipitales y estudiadas posteriormente para este caso.

Como consecuencia de todas estas observaciones, podemos deducir tres conclusiones importantes en relación con las variables cuyo valor es superior en los animales estresados que en los controles.

En principio, una porción de este conjunto de variables deben ser enjuiciadas a la luz de un reforzamiento del complejo occipital argumentado por la única variable que muestra cambios significativos.

Por otra parte, el número total de variables que parecen sufrir un aumento como resultado de la exposición al ruido se reduce al considerar que muchas de ellas están incluidas en otras y, por lo tanto, contribuyen a su aumento.

Y en tercer lugar, la información proporcionada por las distintas variables puede resultar redundante, dificultando un análisis de por sí complejo dado el elevado número de éstas. En relación a esta última observación conviene explicar que el diseño de las variables a estudiar, así como el establecimiento de los diferentes índices, obedece a un concepto clásico dentro de los estudios craneométricos, la mayor parte de las veces aplicados a la antropometría ya que no hemos encontrado trabajos craneométricos de esta naturaleza específicamente aplicados a micromamíferos, ni siquiera a otros mamíferos a excepción de primates (Pucciarelli y cols., 1990; Corner y Richtsmeier, 1992). Sin embargo, como hemos visto, nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad, cuando se emprenden estudios de este tipo, de considerar variables que nos ofrezcan información complementaria y no repetitiva. Por ello hemos incluido, como uno más de los objetivos de esta Tesis, determinar cuáles de las variables habitualmente consideradas son las más significativas a la hora de establecer los efectos sobre el crecimiento craneal de cualquier tratamiento durante el

periodo biológico concreto que nosotros estamos estudiando en la rata, y cuáles suministran una mayor y mejor información. Este objetivo será abordado posteriormente mediante la aplicación de los tests bioestadísticos de análisis multivariante, que nos permitirán analizar el patrón de crecimiento craneal de estos animales durante el periodo de edad considerado.

Continuando con la craneometría de los animales expuestos al ruido tenemos otras nueve variables que reducían su valor, sin alcanzar significación estadística, respecto a los animales control. Con las naturales reservas debidas a la falta de significación podríamos sospechar que estas nueve variables fuesen las más susceptibles a los efectos sobre el crecimiento producidos por el exceso circulante de corticosterona que estos animales muestran y que la ausencia de significación en los resultados podría explicarse, al igual que ha ocurrido con otros parámetros, porque dicho exceso circulante de corticosterona se encuentra dentro de unos niveles moderados. Resultados todavía no analizados, relativos a índices o a los efectos de los restantes tratamientos, nos arrojarán argumentos a favor o en contra de esta suposición.

Vemos así como el estudio de variables craneométricas nos proporciona una información por sí misma valiosa pero insuficiente. Es evidente que las regiones óseas o los huesos representados por estas variables no se hallan aislados sino que guardan entre sí relaciones espaciales y funcionales, por lo que la modificación de uno de ellos condiciona a los restantes, al menos aquellos espacialmente más próximos. Por esta razón es importante establecer índices de modo que nos proporcionen una información más completa y real acerca de esas relaciones y de cómo son alteradas por los diferentes tratamientos. En consecuencia, el criterio que vamos a seguir a la hora de discutir los resultados de cada grupo será analizar, a continuación de las variables, cómo se comportan estos índices y qué información añaden o modifican.

Poniendo en práctica este criterio, la estimulación sonora sólo provoca un aumento significativo del índice interorbitario longitudinal (L-interor), que relaciona la anchura interorbitaria (9-9') con la longitud del neurocráneo (neuro). Efectivamente, si recordamos, la anchura interorbitaria era una de las variables que mostraban un aumento no significativo y cuya discusión aplazábamos para este momento, mientras que por el contrario la longitud del neurocráneo se reduce también de forma no significativa. En este sentido, el índice nos ayuda a corroborar estos efectos moderados dándoles significación cuando las dos

variables se relacionan entre sí y, además, nos indica que la proporcionalidad entre estas dos dimensiones se modifica significativamente. Este resultado es consecuencia, en este caso, de la diferente susceptibilidad que muestran los huesos a ser afectados en su crecimiento por este tratamiento, y del hecho de que las alteraciones cuando se producen son moderadas.

Aunque no aparezcan alteraciones significativas en otros índices que relacionan anchuras con otras dimensiones, y ya que una de las variables contenidas en el índice L-interor es la anchura interorbitaria, nos parece interesante comentar qué efecto ejerce la exposición al ruido sobre las otras dos medidas relativas a la anchura craneal. Así, observamos que la anchura bicigomática (7-7') se reduce de forma no significativa mientras que la anchura máxima del cráneo (8-8') no se modifica. Estos resultados indican, nuevamente, una modificación de la proporcionalidad del cráneo de estos animales en relación a los animales control, de manera que en su porción anterior es más ancho y en su porción media más estrecho, no alterándose la anchura en su porción posterior. De las alteraciones de proporcionalidad entre las diferentes dimensiones que acabamos de mencionar, podemos concluir que parecen estar produciéndose cambios en la morfología craneal, idea ésta que habremos de discutir posteriormente teniendo en consideración los resultados obtenidos en los restantes tratamientos.

Por otra parte, la alteración que muestra el comentado índice L-interor nos confirma la reducción de la longitud del neurocráneo (neuro), que no alcanzaba significación al ser considerada de forma individual. La longitud del neurocráneo contribuye a la reducción no significativa de la longitud total (A-B) ya que se halla incluida en ella. También otras dos variables, longitud bulo-intermaxilar (K-R) y longitud del arco dental mínimo (K-M), muestran reducciones no significativas y es interesante hacer notar que, al igual que las que acabamos de mencionar, representan gran parte de la longitud del cráneo. Otra variable disminuida por la exposición al ruido es la anchura bicigomática, ya mencionada, y por lo tanto también podrían disminuir los valores de aquellas variables en cuya definición participa algún punto anatómico del arco cigomático: longitud cigobregmática (C-F), longitud yugofrontomaxilointermaxilar máxima (D-J), longitud yugonasal máxima (D-E) y longitud cigointermaxilar (C-I). En efecto, así ocurre con todas ellas a excepción de la última que se relaciona, como ya vimos, con los huesos nasales. Por consiguiente vemos que una región del cráneo susceptible a ser modificada en su crecimiento es en su conjunto la región cigomática. Es el momento de mencionar que las citadas "longitudes" que dimensionan el arco cigomático

son tales longitudes en su definición pero, espacialmente, pueden estar representando a su vez dimensiones de anchura e incluso de altura, dentro del arco cigomático y en la relación de éste con otras estructuras craneales (para una mejor comprensión acudir a la Figura 4). Por lo tanto, la consecuencia del conjunto de las alteraciones que estamos comentando resulta en un menor resalte del propio arco cigomático respecto a la totalidad del cráneo, lo cual también se traduce en un cambio morfológico del mismo.

Por consiguiente tenemos aquí el grupo de variables cuyo valor tiende a reducirse, comportamiento éste que entra dentro de los posibles efectos sobre el crecimiento esperados en estos animales. Además conviene destacar, según lo expuesto en el párrafo anterior, la asociación de parte de estas variables con el arco cigomático. Aunque el índice L-interior nos proporciona, en el caso de la longitud del neurocráneo, significación a esta modificación, el resto de las variables varían nuevamente de forma no significativa y, por lo tanto, cualquier conclusión extraída sólo a la luz de estos resultados deberá ser confirmada al intensificar la acción glucocorticoide en los otros tratamientos.

En conjunto, en los animales expuestos al ruido encontramos tres diferentes tendencias:

Un aumento de variables que nos indican un reforzamiento de la zona occipital, principalmente de crestas y cóndilos. Esta tendencia alcanza en la variable longitud cóndilo-basal significación estadística y es confirmada por el aumento significativo de la profundidad y separación condílea.

Una reducción no significativa de algunas variables de anchura o longitud, parte de las cuales están asociadas con los arcos cigomáticos, lo que parece indicar una disminución de la anchura que éstos delimitan, y otra parte resultan ser longitudes de distintas zonas del cráneo, con especial mención del neurocráneo ya que la variación significativa del índice L-interior otorga peso estadístico, en este caso, a la reducción no significativa de la longitud del neurocráneo.

Y en tercer lugar, un aumento, también no significativo, de variables que parecen relacionarse con el esplanocráneo, concretamente con las zonas nasal y palatina que, al no tener ningún sustento significativo, podría ser efecto exclusivo del azar.

Como consecuencia de la pérdida de proporcionalidad entre dimensiones que muestran estos resultados, se produce una tendencia al cambio morfológico que ya ha hemos comentado.

A continuación vamos a discutir los resultados encontrados en los animales tratados con ACTH. Este tratamiento representa, frente a la exposición al ruido, una mayor actividad glucocorticoide y este hecho se manifiesta claramente sobre la craneometría. De las 23 variables craneométricas, 18 muestran una reducción significativa (superior al 78%). Otras cuatro también presentan, si bien de forma no significativa, una disminución de su magnitud aunque, como veremos posteriormente, dos de ellas no serán alteradas significativamente cualquiera que sea la intensidad de los tratamientos.

En consecuencia se puede observar una reducción clara y generalizada del crecimiento craneal, que se hace efectiva en la mayor parte de las variables estudiadas. Con respecto a la exposición al ruido, de las nueve variables en las que se podía sospechar un posible efecto reductor por dicho tratamiento, siete muestran este efecto significativo por la administración de ACTH. Tres de ellas, longitud cigobregmática (C-F), longitud yugonasal máxima (D-E) y anchura bicigomática (7-7'), corresponden a las variables que relacionábamos con los arcos cigomáticos, y, en consecuencia, con la relación que se establece entre estos y otras partes del cráneo. Efectivamente, la mayor intensidad del tratamiento consigue una reducción significativa de estas variables confirmando la tendencia observada en el tratamiento de intensidad más moderada y mostrando que en los animales estresados este efecto, aunque no significativo por su baja intensidad, no parece ser sin embargo consecuencia del azar. Las otras cuatro representan gran parte de la longitud craneal, tanto por su región dorsal (longitud total y del neurocráneo), como por la ventral (longitudes del arco dental mínimo y bulo-intermaxilar), verificándose en el tratamiento con ACTH una reducción generalizada de la longitud del cráneo que ya se intuía de forma no significativa en los animales expuestos al ruido.

En los animales administrados con ACTH, las variables relacionadas con un posible reforzamiento de la región occipital, incluyendo a la propia longitud cóndilo-basal (10-12), no sólo no aumentan, sino que se reducen dado el efecto reductor más potente de este tratamiento sobre el crecimiento. Lo mismo va a suceder, como veremos

posteriormente, en los tratamientos de mayor intensidad confirmándose la hipótesis, previamente establecida en el tratamiento con estrés, acerca de que el posible reforzamiento occipital no fuese debido ni a una alteración del crecimiento, ni a una acción generalizada de los glucocorticoides, sino a un efecto específico del modelo estresante ya que, de no ser así, sería de esperar una intensificación del efecto en los sucesivos tratamientos.

En cuanto al resto de las variables, cuya magnitud era mayor (no significativamente) en los animales estresados que en los controles, tales como las longitudes basal y palatina, las englobadas por ellas y las asociadas a los huesos nasales, todas ellas experimentan ahora una disminución significativa. Estos resultados permiten rechazar la hipótesis respecto a una variación dimensional de la zona naso-palatina en los animales estresados; y se deduce que el aumento no significativo de estas variables encontrado en la exposición al ruido es una circunstancia aleatoria, y no refleja ningún efecto producido por el tratamiento. El hecho de que estas variables no estuvieran reducidas por el ruido sería, por supuesto, consecuencia de la asociación entre la menor sensibilidad de las mismas y la baja intensidad de ese tratamiento. Ambas circunstancias harían necesaria la mayor actividad representada por la administración con ACTH para que los efectos reductores sobre el crecimiento se manifestasen en estas variables.

Todo lo expuesto nos lleva de nuevo a considerar que las regiones óseas representadas por las variables craneométricas parecen mostrar, en este periodo de la vida de los animales, una distinta susceptibilidad a las alteraciones del crecimiento. Hecho éste que ya se puso de manifiesto durante la discusión de los resultados craneométricos hallados en los animales expuestos al estrés, así como durante la discusión del estudio de otros parámetros tales como el desarrollo de los órganos.

Desde esta óptica puede explicarse ahora el comportamiento de las variables craneométricas en el tratamiento con ruido clasificándolo en cuatro grupos:

Al ser la actividad glucocorticoide de intensidad moderada, sólo podría dejar notar su acción reductora sobre las variables más susceptibles a este efecto. Aunque alcanzando significación sólo a través del efecto sobre el índice L-interior, esto es realmente lo que ocurría con las variables representativas de la longitud del cráneo y con aquellas que representan a la zona de los arcos cigomáticos. Efectivamente, el tratamiento más intenso con

ACTH demostrará que esta región es la más sensible y la primera en modificarse.

La baja intensidad del tratamiento con ruido no alcanzaría efectos estadísticamente valorables sobre otro conjunto de variables menos sensibles a este efecto y que, por lo tanto, mostrarían una tendencia no significativa a reducirse, pero que sí serían afectadas por el tratamiento con ACTH.

En tercer lugar, la exposición al ruido no alteraría de ninguna forma a otras variables más resistentes a ser modificadas, algunas de las cuales podrán ser o no afectadas por los tratamientos de mayor intensidad.

Por otra parte, estarían aquellas variables sobre las que la exposición al ruido podría mostrar un efecto peculiar ajeno a las alteraciones del crecimiento que estamos estudiando, tal y como hemos discutido ya en relación con el complejo occipital.

Como los resultados señalan, la intensidad superior del tratamiento con ACTH logra que tanto las zonas óseas más susceptibles a modificar su crecimiento, como aquellas que lo son en menor grado, alcancen la significación. Incluso la longitud cóndilo-basal (10-12), incluida en el complejo occipital y única variable que la exposición al ruido aumentaba significativamente su valor, es reducida de forma significativa en los animales tratados con ACTH demostrando claramente que, en los animales estresados, el aumento de ésta y otras variables con un comportamiento similar es consecuencia de efectos propios de esa exposición y ajenos al crecimiento o a la actividad glucocorticoide.

Como ya hemos comentado, los resultados del tratamiento con ACTH muestran que en alguna de las zonas óseas parece existir cierta resistencia al efecto reductor ejercido por los tratamientos. En consecuencia, se requiere una intensidad mayor de la actividad glucocorticoide para que resulten afectadas. Así ocurre con las variables: longitud nasal (B-E), longitud yugo-frontomaxilointermaxilar máxima (D-J), altura del foramen magnum (2-3), anchura interorbitaria (9-9') y longitud del hueso supraoccipital (G-1). Respecto a las dos primeras es necesario acudir a los grupos tratados con dexametasona para hallar una reducción significativa de las mismas, mientras que las tres últimas no son reducidas cualquiera que sea la intensidad del tratamiento experimental, indicando una importante tendencia a permanecer constantes aún cuando el cráneo haya sufrido una considerable reducción de su

crecimiento.

Para completar los resultados obtenidos acudimos al análisis de los índices craneométricos y observamos que 16 de los 47 índices estudiados muestran una modificación significativa frente al grupo control. En nueve de estos índices se hallan implicadas variables asociadas con el arco cigomático. Recordemos que ya en los animales expuestos al ruido la región cigomática apuntaba como una de las más susceptible a ser reducida en su crecimiento. Efectivamente el tratamiento con ACTH, de acción glucocorticoide más intenso, aumenta claramente el efecto sobre esta zona y su mayor sensibilidad es confirmada cuando se analizan los índices denominados bicigomático total (I-bicigom), cigobasal transversal (T-cigobas) y cigobregmático total (I-cigobre), los cuales muestran una reducción significativa. Los dos primeros relacionan, respectivamente, la anchura bicigomática (7-7') con la longitud total (A-B) y con la longitud basal (3-12), mientras que el último relaciona la longitud cigobregmática (C-F) con la longitud total (A-B). Considerando que todas estas variables presentan una reducción significativa por el tratamiento con ACTH, la variación encontrada en estos tres índices señala que la anchura bicigomática y la longitud cigobregmática disminuyen en mayor medida que las longitudes total y basal. Estas relaciones nos permiten pensar en un mayor efecto reductor del tratamiento sobre la región del arco cigomático que sobre la longitud del cráneo aunque ambas están siendo reducidas por el exceso de corticosterona circulante.

Esta misma conclusión se deduce del estudio de otros cinco índices que relacionan las longitudes prepalatina (5-12), palatina (11-12), maxilar (5-6), nasal (B-E) y del arco dental mínimo (K-M) con la ya comentada anchura bicigomática (7-7'). Los índices, definidos en la Tabla 15, corresponden respectivamente al T-prepala, T-palatin, T-maxilar, T-nasocig y T-diastem, y al aumentar sus valores indican una reducción de dichas longitudes en menor medida que la correspondiente variable del arco cigomático. Por lo tanto los efectos reductores sobre el arco cigomático son más intensos que sobre el resto del esplanocráneo.

Una vez más, la mayor susceptibilidad de esta zona se confirma cuando evaluamos dos nuevos índices: craneofacial transversal (T-craneof) y cigobregmático transversal (T-cigobre), de modo que esta característica se pone de manifiesto no sólo en relación con la longitud del cráneo, como ya hemos discutido, sino también frente a la anchura máxima (8-8') del mismo. Efectivamente estos índices, que relacionan la anchura bicigomática

(7-7') y la longitud cigobregmática (C-F) con la anchura máxima del cráneo (8-8'), se reducen de forma significativa revelando que los cráneos muestran una reducción más acentuada del crecimiento de la región cigomática que de la anchura máxima.

Todos estos resultados inciden en la mayor sensibilidad de la zona cigomática del cráneo a la reducción de su crecimiento, y también confirman la sospechada tendencia deducida de los resultados evaluados en los animales expuestos al ruido, demostrando claramente este efecto cuando la intensidad del tratamiento aumenta. El efecto reductor del tratamiento sobre la zona cigomática hace que, como ya mencionamos, los arcos sobresalgan menos respecto del resto del cráneo y es un ejemplo claro de alteraciones morfométricas que podrían, mediadas por mecanismos endocrinos, darse ante determinadas situaciones ambientales. A este respecto debemos señalar que desde el punto de vista de los niveles circulantes de corticosterona, la situación representada por la administración de ACTH, aunque más intensa que la provocada en nuestro caso por el ruido, no es en absoluto extrema pudiéndose encontrar niveles circulantes de glucocorticoides similares o próximos inducidos por la exposición a agentes estresantes bastante cotidianos.

Por otra parte, la diferente susceptibilidad de las variables no sólo se deduce del comportamiento de los índices que contienen aquellas asociadas con la región cigomática, sino también de otros caracterizados por relacionar entre sí variables representativas de otras zonas óseas diferentes del arco cigomático. Es el caso de tres índices: L-maxilar, L-palatin e I-basiocc, que relacionan entre sí sólo variables de longitud. Los dos primeros, que aumentan significativamente, relacionan respectivamente las longitudes maxilar (5-6) y palatina (11-12) con la longitud basal (3-12), mientras que el tercero, que sufre una significativa reducción, relaciona la longitud basioccipital (3-4) con la longitud total (A-B). Los tres índices ponen de manifiesto que las longitudes basal y basioccipital muestran una mayor reducción que las otras variables de longitud argumentando que, después de la zona cigomática, son las dimensiones longitudinales de la base del neurocráneo las más sensibles a los efectos reductores de los glucocorticoides.

Todos los índices discutidos reflejan además una pérdida de proporcionalidad entre las diferentes dimensiones que consideran. Consecuentemente se produce una clara alteración de la forma craneal que tiene su máximo exponente en la región cigomática dada su mayor susceptibilidad a ser alterada en su crecimiento, seguida al parecer de

las dimensiones de longitud, sobre todo de las variables del neurocráneo por su región basal.

Respecto al hueso supraoccipital, habíamos comentado anteriormente como era una de las zonas óseas que parecían mostrar cierta resistencia al efecto de los tratamientos de modo que, con independencia de la intensidad de los mismos, y aun cuando el efecto reductor sobre el resto del cráneo es generalizado, su crecimiento no se reduce ni siquiera en los tratamientos con dexametasona como veremos en su momento. En efecto, tres índices dan constancia de este hecho: I-supraoc, L-supraoc y T-supraoc, que relacionan la variable longitud supraoccipital (G-1) con las longitudes total (A-B), del neurocráneo (neuro) y con la anchura máxima del cráneo (8-8'). El aumento significativo del valor de dichos índices apoya la tendencia de este hueso a no mostrar un efecto reductor por el tratamiento, mientras que tal efecto sí se hace patente sobre el crecimiento de las zonas óseas representadas por las otras variables implicadas que se encuentran en los denominadores de los citados índices.

Seguidamente vamos a discutir el efecto que una actividad glucocorticoide más intensa ejerce sobre las variables ya conocidas. En primer lugar, una visión descriptiva y rápida pone de manifiesto que la administración crónica de dexametasona aumenta de 18 a 20 el número total de variables reducidas de forma significativa, lo cual supone, respecto de las 23 variables craneométricas estudiadas, un efecto superior al 87%. Las tres variables restantes corresponden a la longitud supraoccipital (G-1), altura del *foramen magnum* (2-3) y anchura interorbitaria (9-9'), en relación a las cuales ya hemos comentado que ninguna de ellas se reduce significativamente cualquiera que sea el grupo considerado.

Si establecemos una comparación entre los tratamientos con ACTH y dexametasona observamos que, de las 20 variables que son alteradas significativamente frente al control, aparecen nueve que muestran una reducción más acentuada en el grupo Dx. Si analizamos estas variables atendiendo a su distribución en la región dorsal y ventral del cráneo, nos encontramos dos tendencias diferentes.

En primer lugar, las variables localizadas en la zona dorsal: longitud intermaxilonasal máxima (E-I) y longitud cigointermaxilar (C-I) guardan una relación más o menos estrecha con la parte rostral. Respecto a la región ventral, si bien entre las variables cuya reducción es superior en el grupo Dx que en el Ac hay algunas que no parecen confluir, con preferencia, en una zona determinada del cráneo, otras: longitud palatina (11-12), longitud

maxilar (5-6), longitud prepalatina (5-12) y longitud del arco dental mínimo (K-M) también se relacionan con el esplanocráneo. En consecuencia, el superior grado de actividad glucocorticoide que la administración de dexametasona representa frente a la de ACTH, intensifica el efecto reductor sobre variables que parecen concentrarse en la región rostral, mientras que no sucede así sobre otras regiones del cráneo que están siendo alteradas en el mismo grado que por el tratamiento con ACTH. Esto nos hace sospechar que si bien a bajas intensidades el esplanocráneo no responde y parece ser menos sensible al efecto glucocorticoide, luego se muestra más plástico que otras regiones y puede sufrir cambios mayores proporcionales a la intensidad o grado de dicho efecto.

Pero, como hemos dicho, no todas las variables de la zona ventral del cráneo que muestran un efecto más intenso por el tratamiento con dexametasona corresponden al esplanocráneo. Parte de esas variables pertenecen al neurocráneo y es interesante señalar que entre ellas se encuentran nuevamente algunas de las implicadas en el reforzamiento occipital hallado en la exposición al ruido. Al igual que ocurría con la administración de ACTH, este dato corrobora de nuevo que este efecto es específico de ese tratamiento y no está vinculado a ningún otro mediado por la actividad glucocorticoide, ya que dicha actividad no aumenta la magnitud de esas variables sino que, por el contrario, las reduce y además lo hace en proporción al grado de la actividad glucocorticoide representada por los tratamientos.

Una vez que los resultados de los distintos tratamientos nos demuestran que esta acción es específica del ruido, es conveniente entrar en una discusión que habíamos venido aplazando. Evidentemente la remodelación de una zona de inserción muscular, como es la región occipital, es consecuencia de un mayor desarrollo o actividad de los músculos que en ella se insertan, en este caso los músculos que forman el cuello del animal y que están implicados en la sujeción y rotación de la cabeza. A su vez, este mayor desarrollo podríamos explicarlo o por un incremento del peso cefálico o por una mayor actividad física realizada por el animal en respuesta a nuestro modelo de estrés, y que implique concretamente a estos músculos.

Referente a un mayor peso de la cabeza, ya conocemos sin embargo que, precisamente, el peso del cerebro se reduce significativamente en los animales estresados (Tabla 8) por lo que procedimos a pesar el cráneo de estos animales y compararlo con el de los controles, resultados que aparecen a continuación en la Tabla 18 y en la que observamos que

también el peso del cráneo es reducido por la elevación de corticosterona circulante mediada por el estrés.

De esta manera queda descartada la posibilidad de reforzamiento muscular para soportar un peso mayor, además de obtener un nuevo dato que nos informa de una pérdida de masa ósea en estos cráneos.

PESO CRANEAL (g)		
	Co	Str
Peso del cráneo	2.45 ± 0.15 b	2.26 ± 0.13 a
Anova	Grupo experimental F (1,15) = 7.71 p ≤ 0.05	

Tabla 18: Peso craneal (g).

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los superíndices representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a= Co y b= Str.

Estos datos, que inicialmente no estaba previsto que se tomaran, son importantes porque constituyen un argumento más a favor de que el ruido está reduciendo el desarrollo craneal a través de la actividad glucocorticoide que representa, si bien de forma muy moderada lo que impide alcanzar matematicamente significación a muchas variables dimensionales sobre todo cuando éstas son menos sensibles al efecto.

Respecto al posible aumento de actividad general del animal por la exposición al ruido deberíamos considerar si hay una implicación de los músculos cervicales y nucales en las actividades locomotora y/o exploratoria, en cuyo caso una estimulación de estas conductas podría explicar el reforzamiento de los músculos mencionados. En principio la implicación de los músculos del cuello en la actividad locomotora resulta incierta cuando, por otra parte, no se observan alteraciones sobre la musculatura de las extremidades, más relacionadas logicamente con este tipo de actividades. Sí es más probable su implicación en la actividad exploratoria, por ejemplo en relación con la denominada "postura erguida", una conducta estereotipada asociada en los roedores con el comportamiento exploratorio. Sin

embargo, dado que los animales no son expuestos a un ambiente nuevo durante la sesión de estrés, es difícil pensar en una estimulación de esta actividad. Por el contrario, numerosos estudios (Noble y Delini-Stula, 1976; Lanum y cols., 1984; Lemoine y cols., 1990) y nosotros mismos (Gamallo y cols., 1986b; Gamallo y cols., 1988) constatamos como las exposiciones a estrés inespecífico, conducen a una reducción del comportamiento exploratorio durante las pruebas de campo abierto y otros tests. Nuestras observaciones, aunque no han sido registradas en forma de datos concretos, nos permiten asegurar que durante la exposición al ruido no se ha producido un aumento del número de posturas erguidas de los animales y que su actitud era, por el contrario, de quietud y alerta salvo esporádicas sacudidas de la cabeza.

Buscando una relación entre la peculiar estimulación sensorial contenida en el modelo de estrés utilizado y una aparente mayor actividad de los músculos del cuello, nosotros sugerimos que, durante la exposición crónica al ruido, los animales podrían estar efectuando movimientos relacionados con el cuello y la cabeza con la probable intención de eliminar los efectos molestos del estímulo sonoro.

Otra actividad muscular asociada a los músculos cervicales podría consistir incluso, con una alta probabilidad, en contracciones isométricas que mantendrían un "cierto tono" de esos músculos y una consecuente rigidez en esta parte de la anatomía del animal tan cercana a los pabellones auditivos. Esta idea parece razonable puesto que una respuesta motora refleja de "atención" o "alerta" de estos músculos tiene un significado biológico obvio en relación con la entrada sensorial auditiva ya que dichos músculos se encuentran implicados en la orientación de la cabeza y de los pabellones auditivos frente a la llegada del estímulo.

La idea que acabamos de discutir apunta entonces al mayor desarrollo muscular local como causa del reforzamiento de la superficie ósea sobre la que éstos músculos se insertan. Esta es la única explicación que nosotros encontramos a estos resultados pero, evidentemente, se encuentra dentro del terreno de la hipótesis ya que debería ser verificada con otros datos de los que por ahora no disponemos ni entran dentro de los objetivos de este trabajo.

Cuando se analizan los índices craneométricos de los animales tratados con dexametasona, 13 de ellos se modifican significativamente frente al grupo control. Este

menor número de índices significativos, trece, frente a los dieciseis hallados cuando analizábamos los resultados del grupo tratado con ACTH es precisamente lo primero que nos llama la atención. El balance total entre ambos grupos es de tres índices de diferencia, sin embargo ello es el resultado de la desaparición, en términos de significación estadística, de 11 de los índices observados en el grupo Ac y la incorporación, por lo tanto, de ocho nuevos que adquieren por el tratamiento con dexametasona significación frente al control.

Nos restan cinco índices que mantienen los efectos vistos en el tratamiento con ACTH y que demuestran que el tratamiento con dexametasona no ha intensificado tales efectos, ya que no existen para estos índices diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por lo tanto, la mayor intensidad de la acción glucocorticoide del tratamiento con dexametasona aunque, como hemos visto, haya intensificado sus efectos sobre las variables individualmente, no ha modificado las relaciones entre las incluidas en estos cinco índices. Sin embargo, como veremos a continuación, ha establecido nuevas relaciones entre otras variables, haciendo que ciertos índices significativos en el grupo Ac pierdan dicha significación y otros nuevos la adquieran.

Conviene analizar cuales son estos cinco índices que se mantienen constantes respecto al tratamiento con ACTH. Corresponden a los índices craneofacial transversal (T-craneof) y cigobregmático transversal (T-cigobre) que relacionan variables de la región cigomática con la anchura máxima del cráneo. Los índices supraoccipital total (I-supraoc) y supraoccipital longitudinal (L-supraoc) que suponen relaciones entre la longitud supraoccipital (una de las variables descritas como resistentes al efecto de los tratamientos) y distintas longitudes. Un quinto índice, basioccipital total (I-basiocc), que relaciona entre sí la longitud basioccipital y la longitud total del cráneo.

Siguiendo las ideas que se han ido apuntando al discutir los resultados de los otros tratamientos, los dos primeros índices mencionados en el párrafo anterior nos sugieren hacer un análisis de los efectos sobre la región cigomática. Efectivamente ambos índices al reducirse significativamente nos señalan que variables representativas del arco cigomático, anchura bicigomática (7-7') y longitud cigobregmática (C-F), muestran respecto a los animales control una reducción significativa por la administración de dexametasona mayor que la que se produce sobre la anchura máxima. De nuevo estos índices confirmarían que el efecto reductor del tratamiento es mayor sobre el crecimiento de la región cigomática que sobre

el de otras dimensiones, en este caso la anchura del cráneo, también a la intensidad de acción glucocorticoide representada por la administración de dexametasona. Este efecto era ya intuido en los individuos expuestos al ruido y posteriormente confirmado en los tratados con ACTH.

La mayor intensidad del tratamiento con dexametasona no supone, sin embargo, que existan para estos índices diferencias significativas frente al tratamiento con ACTH, lo cual indica que la relación que se establece entre las variables se mantiene constante bajo los efectos tanto de la ACTH como de la dexametasona. Por lo tanto la reducción de la zona cigomática se hace en este momento independiente de la intensidad del tratamiento. O lo que es lo mismo, aun siendo una zona muy sensible que muestra reducción de su crecimiento a baja intensidad del tratamiento, "agota" pronto su tolerancia a ser afectada. También para la variable anchura máxima del cráneo, la actividad glucocorticoide representada por el tratamiento con ACTH constituye el umbral o límite superado el cual no se consigue intensificar el efecto reductor sobre la misma pero, a diferencia de las variables relacionadas con la región cigomática, la anchura máxima del cráneo es menos sensible requiriéndose intensidades de acción glucocorticoide superiores para que su crecimiento se reduzca e incluso cuando todas estas variables muestran el efecto reductor a una determinada intensidad de tratamiento, siguen siendo las variables cigomáticas las que se reducen en mayor medida que la anchura máxima del craneo.

Sin embargo, sería conveniente ver como se comportan, en este caso, otros índices que impliquen variables de la región cigomática. Precisamente observamos que, entre los once índices que han perdido significación en los animales tratados con dexametasona respecto al control, ocho de ellos implican variables asociadas con esta parte del cráneo. El hecho de que la región cigomática haya alcanzado su máxima respuesta respecto al efecto reductor de los tratamientos nos permite explicar la pérdida de significación de estos ocho índices.

Efectivamente, ya que lo ocurrido es que el resto de variables contenidas en estos índices que eran inicialmente menos susceptibles al efecto reductor de los tratamientos, se reducen en mayor grado por la administración de dexametasona que por la de ACTH. De esta forma, la mayor intensidad del tratamiento con dexametasona no consigue acentuar la reducción experimentada por las variables asociadas a la zona cigomática y causada por la ACTH, pero sí logra que las otras variables con las que se relacionan a través de los

índices se reduzcan en mayor medida. Como consecuencia, la reducción que muestran las variables de cualquiera de los índices discutidos es de igual magnitud y, por lo tanto, el índice pierde significación estadística. Además estos resultados demuestran que el efecto reductor del tratamiento con dexametasona es más contundente sobre el conjunto del cráneo y ponen de manifiesto como la intensidad creciente de los tratamientos conduce a una transición de variables en cuanto a su margen de tolerancia para ser reducidas.

La siguiente cuestión que suscita nuestro interés y que guarda relación con lo que acabamos de exponer es el hecho de que sólo sigan alcanzando significación aquellos índices que relacionan variables del arco cigomático precisamente con la anchura máxima del cráneo (8-8'). Sin embargo, los índices que perdían significación eran aquellos que relacionaban la región cigomática con variables que representan claramente dimensiones de longitud, las cuales eran reducidas más intensamente por la dexametasona. Consecuentemente ambos hechos nos permiten suponer que la anchura máxima es una variable poco susceptible de ser modificada no sólo respecto a las variables de la región cigomática sino también respecto a aquellas relacionadas con la longitud del cráneo y que las variables de longitud, que a bajas intensidades respondían menos que la zona cigomática, mantienen más su plasticidad frente a intensidades de acción glucocorticoide altas.

Esta suposición podría confirmarse observando que sucede con los índices que relacionan la anchura máxima con variables de longitud. En el tratamiento con dexametasona encontramos que uno de los ocho índices que se incorporan como significativos es el denominado basioccipital transversal (T-basiocc) que relaciona la longitud basioccipital (3-4) con la anchura máxima. Este índice al disminuir su valor señala que el efecto reductor del crecimiento producido por el tratamiento con dexametasona es menor sobre la anchura máxima que sobre la longitud basioccipital. Como veremos posteriormente, en el tratamiento conjunto con dexametasona y ruido, al intensificar la acción glucocorticoide este comportamiento se hace extensivo a índices que incluyen variables (longitud del neurocráneo y longitud total) más representativas de la dimensión longitudinal del cráneo que la contenida en el índice T-basiocc.

Además no debemos olvidar que el índice basioccipital total (I-basiocc) se reduce significativamente siendo uno de los cinco que mostraban este comportamiento ya en el tratamiento con ACTH. Este resultado indica que la longitud basioccipital es también más sensible al efecto reductor de los tratamientos que la longitud total del cráneo porque siendo la

reducción de la longitud total significativamente más acentuada por la administración de dexametasona que por la de ACTH, no es suficiente para igualar en proporción a la que experimenta la longitud basioccipital aún cuando ésta no difiere entre ambos tratamientos.

Esto no sólo pone en evidencia que las variables que representan longitudes totales son menos susceptibles inicialmente que otras también longitudes pero menos representativas de la totalidad del cráneo, sino también que la longitud basioccipital (una de las más sensibles al efecto reductor de los tratamientos y con la que argumentábamos que, después de la región cigomática, la siguiente zona craneal más variable era la parte basal del neurocráneo) alcanza a la intensidad del tratamiento con ACTH su máxima respuesta a dicho efecto. No sucede así con las variables relacionadas con el esplacnocráneo, menos sensibles que las del neurocráneo pero más plásticas ya que continúan reduciéndose de forma más acentuada por el tratamiento con dexametasona. Esta conclusión nos la confirma tanto el que seis de las nueve variables que muestran una reducción significativamente mayor en el grupo Dx que en el Ac guarden relación con el esplacnocráneo, como el hecho de que es precisamente a la intensidad representada por el tratamiento con dexametasona cuando dos de las cinco variables, que ya en la discusión de los resultados en los animales estresados vimos que parecían ofrecer cierta resistencia a ser modificadas, son reducidas de forma significativa y además forman parte de la zona del esplacnocráneo.

En consecuencia, podemos decir que estos resultados ponen de manifiesto una transición entre la zona del neurocráneo y del esplacnocráneo en relación a su margen de tolerancia al efecto reductor de los tratamientos sobre su crecimiento. Es decir, a esta edad de los animales, el esplacnocráneo muestra una mayor plasticidad que el neurocráneo a los cambios pues sus márgenes de respuesta son más amplios. Sin embargo, a bajas intensidades es el neurocráneo la región más susceptible a ser modificada, aun cuando de forma moderada. Así, los cambios más drásticos se van a dejar sentir en el esplacnocráneo y no en el neurocráneo que está más "protegido".

Conviene quizás en este momento insistir en dos conceptos que hemos estado utilizando y que aunque son diferentes están relacionados por lo que pueden crear confusión: uno es el de mayor o menor sensibilidad al efecto reductor de los tratamientos, de modo que decimos que una variable es muy sensible cuando a bajas intensidades de la acción glucocorticoide representada por los tratamientos muestra ya una reducción de su crecimiento,

mientras que es poco susceptible cuando se requieren intensidades superiores para que dicha variable manifieste ese efecto, pero también utilizamos este concepto cuando a una determinada intensidad de acción glucocorticoide a la que todas las variables muestran el efecto reductor unas lo hacen en mayor medida que otras. El segundo concepto es el de umbral de tolerancia a dicho efecto, que hace referencia a la intensidad de acción glucocorticoide asociada a los tratamientos que actúa como techo o límite a partir del cual intensificar la acción glucocorticoide no intensifica el efecto. De esta forma, las variables o las zonas del cráneo más plásticas son aquéllas que cambian más con independencia de su sensibilidad y es de pensar que su patrón de crecimiento a esta edad está menos estabilizado.

Todo lo dicho hasta ahora indica que las diferencias de sensibilidad de las variables mencionadas a los efectos reductores de los tratamientos establecen el orden en que van mostrando alteraciones según aumentamos la intensidad de la acción glucocorticoide de los mismos. Así se alterarán antes (a menor intensidad) las variables de longitud que las de anchura y de las variables de longitud primero se modifican las parciales (neurocráneo y posteriormente esplacnocráneo) y seguidamente las longitudes totales. Esta es la explicación de que en el tratamiento con dexametasona encontremos como significativo el índice T-basiocc que no lo era a la intensidad representada por el tratamiento con ACTH, y que sea necesaria la mayor intensidad del tratamiento con dexametasona y ruido para encontrar alteraciones en los índices que relacionan la anchura con la longitud total del cráneo.

Como hemos visto, la transición de variables respecto a su diferente sensibilidad frente a los tratamientos, puede deducirse tanto de los índices que adquieren significación, como de aquellos que la pierden, cuando se alcanza determinada intensidad del tratamiento.

Recordemos que de los once índices que pierden significación, ocho ya los hemos tratado en relación con el arco cigomático. Sin embargo, otros dos de estos índices se caracterizan por relacionar entre sí variables de longitud. Igualmente hay un segundo índice de los ocho que adquieren significación por el tratamiento con dexametasona que también establece una relación entre dos variables de longitud. Por lo tanto, ya que la discusión nos ha llevado a analizar este tipo de relaciones resulta el momento adecuado para discutir las.

Los dos índices mencionados en primer lugar son el L-maxilar y el L-

palatin, y relacionan las longitudes maxilar (5-6) y palatina (11-12) con la longitud basal (3-12). Como consecuencia de la mayor intensidad del tratamiento con dexametasona las longitudes maxilar y palatina se reducen en mayor medida que en el tratamiento con ACTH, mientras que la reducción de la longitud basal no difiere entre ambos tratamientos. Como resultado la reducción que muestran estas variables en los dos índices es de igual magnitud y por tanto éstos pierden significación. Un tercer índice que adquiere significación por primera vez es el L-diastem que relaciona la longitud del arco dental mínimo (K-M) con la longitud palatina (11-12). Ambas variables son reducidas en mayor medida por el tratamiento con dexametasona que por el de ACTH y este índice al disminuir señala que dicho efecto reductor es mayor sobre la primera de ellas.

Estos resultados nos apoyan lo dicho respecto a la mayor susceptibilidad de las variables que representan longitudes parciales que las que representan longitudes totales y también acerca del amplio margen de tolerancia que muestran las variables relacionadas con el esplanocráneo, además de indicarnos que entre éstas últimas es la longitud del arco dental mínimo la más sensible al efecto reductor de los tratamientos.

En términos generales, teniendo en cuenta lo discutido y que la anchura máxima (8-8') es la variable que mejor nos representa esta dimensión del cráneo, podemos pensar que, después de las asociadas al arco cigomático, las siguientes variables en mostrar una mayor susceptibilidad al efecto reductor sobre su crecimiento corresponden a las que representan la longitud del cráneo, siendo seguidas a continuación por la anchura del mismo.

Queda por discutir aquellos índices en los que se hallan implicadas variables representativas de zonas óseas cuyo crecimiento no parece reducirse cualquiera que sea la intensidad del tratamiento, permaneciendo más o menos constantes. Dos de estos índices forman parte del grupo de cinco que mantenían los efectos vistos en el tratamiento con ACTH. Otros seis forman parte de los ocho que por primera vez adquieren, por el tratamiento con dexametasona, significación respecto al control.

Los dos índices mencionados en primer lugar implican a la longitud supraoccipital (G-1) relacionándola con distintas longitudes (A-B y neuro), mientras que los seis últimos corresponden a la relación de la anchura interorbitaria (9-9'), o de la altura del *foramen magnum* (2-3) con esas mismas longitudes (A-B y neuro), y además con la anchura

máxima del cráneo.

Todos estos índices aumentan de forma significativa. El aumento de cada uno de ellos evidencia la constancia de estas regiones óseas a no ser afectadas en su crecimiento, mientras que la anchura máxima y las longitudes total y del neurocráneo muestran el efecto reductor debido al tratamiento con dexametasona. Un dato más a favor tanto de la resistencia de la longitud del hueso supraoccipital a su alteración, como también de que nuevamente la anchura máxima muestra su menor reducción respecto a otras dimensiones craneales, es la no significación del índice supraoccipital transversal (T-supraoc), que relaciona dichas variables. Una vez más se confirma el comportamiento de las partes del cráneo representadas por estas tres variables, intuido desde el comienzo de la discusión y afianzado en los sucesivos tratamientos.

A continuación vamos a discutir los resultados hallados en los animales del grupo DxStr. En este grupo, al igual que en los tratados con dexametasona, se reducen significativamente 20 de las 23 variables en estudio. No sólo hay una igualdad numérica entre ambos grupos, sino que también se trata de las mismas variables alteradas por el tratamiento único con dexametasona. Sin embargo, de estas 20 variables, siete presentan una mayor reducción que en el grupo Dx. Estos resultados indican que, además de un generalizado efecto reductor sobre el crecimiento craneal, éste posee una magnitud superior al causado sólo por la administración de dexametasona. En este sentido, los cráneos son más cortos en longitud, tal y como ponen de manifiesto las alteraciones sobre las variables: longitud total (A-B), longitud cóndilo-basal (10-12) y longitud bulo-intermaxilar (K-R), mientras que los cambios del arco cigomático se han estabilizado. Particularmente, parece que esta reducción en longitud responde a modificaciones en la región rostral como apunta la reducción de las variables: longitud de los huesos nasales (B-E), longitud intermaxilonasal máxima (E-I), longitud cigointermaxilar (C-I) y longitud del arco dental mínimo (K-M). Estos resultados avalan el amplio margen que otorgábamos tanto al esplanocráneo como a las dimensiones globales del cráneo.

El mayor efecto reductor que se ejerce sobre estas siete variables, frente a los animales tratados con dexametasona, evidencia además un efecto debido al estrés por ruido que no alcanza significación estadística cuando este agente estresante constituye, por sí solo, el tratamiento experimental. Incluso tres de estas variables fueron analizadas en los

animales estresados entre aquellas que se reducían pero no significativamente. Ello no hace sino corroborar que la ausencia de diferencias significativas por el ruido es debida a que la intensidad moderada de este agente junto con la edad de los animales utilizados, impide modificaciones significativas en el crecimiento craneal cuando los animales son sólo afectados por el ruido. Sin embargo, un efecto sinérgico entre la acción glucocorticoide muy intensa de la dexametasona y la de la mayor secreción de corticosterona (ver Tabla 3 y Figura 5) provocada por la adición de la estimulación sonora crónica a esos animales, es capaz de manifestar claramente el efecto del ruido. Vemos, además, que los resultados coinciden en resaltar este efecto aditivo del ruido sobre las variables de longitud las cuales ya se nos han manifestado más sensibles que otras dimensiones craneales.

Respecto a los índices craneométricos, nueve de ellos se modifican de forma significativa frente al grupo control. Siete de estos nueve índices también eran significativos por el tratamiento con dexametasona, aunque no aparecen diferencias entre ambos tratamientos. Los dos restantes adquieren por primera vez significación en el tratamiento conjunto de dexametasona y ruido. Por otra parte, al aumentar la intensidad del tratamiento se produce la pérdida de significación de seis de los índices que hemos discutido en el tratamiento con dexametasona.

Tratando de seguir el criterio por el que hemos ido discutiendo los índices en otros tratamientos, observamos que dos de los siete índices que mantienen los efectos debidos al tratamiento de dexametasona, craneofacial transversal (T-craneof) y cigobregmático transversal (T-cigobre), vuelven a confirmar la menor susceptibilidad de la anchura máxima, en este caso respecto a las variables asociadas al arco cigomático. Los valores de ambos índices disminuyen de forma significativa, tal y como sucedía en los animales tratados con ACTH y dexametasona, sin que existan diferencias significativas entre el efecto reductor de éstos y el debido al tratamiento conjunto de dexametasona y ruido. Como tampoco existen diferencias entre los tres tratamientos para cada una de las variables de estos índices, estos resultados confirman que la región cigomática alcanzó su máxima respuesta al efecto reductor que corresponde a la intensidad del tratamiento con ACTH.

El hecho de que estos dos índices sigan siendo significativos por el tratamiento conjunto de dexametasona y ruido nos corrobora que la anchura máxima del cráneo es, en efecto, una variable poco sensible a reducirse. La mayor intensidad de este tratamiento

no sólo respalda esta menor susceptibilidad frente a las variables de la región cigomática, sino también frente a variables que representan la dimensión de longitud del cráneo. Recordemos que en el tratamiento con dexametasona hallábamos un índice significativo (T-basiocc) que nos permitía pensar en esta última cuestión. Pues bien, no sólo este índice sino dos más, que corresponden a los que adquieren significación cuando se alcanza la intensidad del tratamiento conjunto, confirman ese hecho. Así los índices I-cefalic y L-cefalic relacionan la anchura máxima con las longitudes total y del neurocráneo, respectivamente, siendo aumentados sus valores frente al control. La importancia de estos dos últimos índices, I-cefalic y L-cefalic, radica en que implican variables que son más representativas de la dimensión longitudinal del cráneo que la variable longitud del hueso basioccipital, presente en el índice T-basiocc, verificando la menor sensibilidad de la anchura del cráneo frente a la dimensión de longitud pero además indicando que las longitudes más representativas de la totalidad del cráneo presentan un margen de tolerancia muy amplio.

Hemos analizado hasta ahora las relaciones entre variables de anchura y longitud, sería interesante siguiendo el criterio establecido conocer que sucede con los índices que relacionan entre sí variables de longitud.

Uno de estos índices es el basioccipital total (I-basiocc) que forma parte de los seis que pierden significación por el tratamiento conjunto de dexametasona y ruido. Otro índice es uno de los siete que mantienen los efectos debidos a la dexametasona: diastema longitudinal (L-diastem). Ambos nos muestran cuales de las variables que representan longitudes son más sensibles al efecto reductor de los tratamientos. Puesto que el primero nos indica que se necesita la mayor intensidad del tratamiento conjunto para que la longitud total se reduzca en igual medida que la longitud del hueso basioccipital y, dado que el segundo nos señala que la longitud del arco dental mínimo se reduce en mayor medida que la longitud palatina, confirmamos que de las variables parciales del esplanocráneo la longitud del arco dental mínimo es la más sensible y que se requiere la acción conjunta de dexametasona y ruido para afectar en mayor medida las variables que mejor representan la longitud del cráneo.

Quedan por discutir tres índices de los siete que mantienen los efectos debidos a la dexametasona: I-foramen, I-interor y L-interor, que relacionan la altura del foramen magnum y la anchura interorbitaria con las longitudes total y del neurocráneo. Todos ellos aumentan su valor señalando de nuevo que la altura del foramen magnum y la anchura

interorbitaria no se modifican mientras que las dos longitudes se reducen. Una vez más estos índices corroboran la resistencia a alterarse de la zona interorbitaria y del foramen magnum a la vez que se produce una reducción generalizada del crecimiento del cráneo que afecta en mayor medida a la longitud.

Queda clara la existencia de una correlación positiva entre el grado de actividad glucocorticoide representado por los diferentes tratamientos y la magnitud de las alteraciones observadas en el crecimiento craneal, así como el hecho de que estas alteraciones resultan en todos los casos mediadas por la correspondiente acción glucocorticoide de la dexametasona administrada o del exceso de corticosterona circulante producido por el estrés o por la administración de ACTH, quedando descartada la implicación de cualquier otro nivel de activación del eje HHA vinculado al estrés. Este hecho es confirmado por los efectos aditivos entre dosis fijas de dexametasona y una adición de secreción de corticosterona endógena por la estimulación sonora en los animales del grupo DxStr. Cualquier sospecha acerca de que los efectos fuesen mediados por la ACTH (por ejemplo, en los grupos Str y Ac) queda descartada ya que en el tratamiento con dexametasona esta hormona mediadora de las acciones del estrés está fuertemente inhibida.

Teniendo en cuenta la correspondencia mencionada entre la intensidad de la acción glucocorticoide de los tratamientos y la de las alteraciones observadas, podemos resumir éstas de la siguiente manera:

La intensidad de la acción glucocorticoide debida al tratamiento con estrés provoca una reducción del crecimiento craneal que sólo se pone de manifiesto sobre las variables más sensibles a dicho efecto. Sin embargo, pese a esta mayor capacidad para ser alteradas, la reducción que experimentan no alcanza significación estadística, verificándose el carácter moderado de este tratamiento. Estas variables están relacionadas con la región cigomática y con la longitud de diversas zonas craneales, especialmente del neurocráneo. La estimulación auditiva repetitiva parece activar la respuesta de músculos nucales y cervicales relacionados con la orientación de la cabeza, cuya mayor actividad remodela reforzando el complejo de inserción occipital de dichos músculos.

La intensidad de la acción glucocorticoide debida al tratamiento con ACTH provoca una reducción significativa del crecimiento craneal que se pone de manifiesto no sólo sobre las variables que ya a la intensidad representada por el tratamiento estresante se mostraban como más sensibles sino también sobre aquellas que lo eran en menor grado, tanto las que contribuían con su aumento al reforzamiento de la región occipital por exposición al ruido, como otras que mostraban asimismo un aumento si bien debido exclusivamente al azar. Este efecto reductor sobre el crecimiento craneal adquiere pues una repercusión generalizada y se caracteriza por ser más acentuado sobre la región cigomática que sobre las variables representativas de la dimensión longitudinal del cráneo, siendo entre éstas últimas aquéllas que se relacionan con la región basal del neurocráneo las que se reducen en mayor medida. Por el contrario, la anchura del cráneo parece ser la dimensión con menos capacidad para ser afectada en su crecimiento, aunque efectivamente resulta alterada. Se inician las alteraciones de las variables del esplanocráneo.

La intensidad de la acción glucocorticoide debida al tratamiento con dexametasona provoca una reducción significativa del crecimiento craneal, igualmente de carácter generalizado pero esta intensidad ya no es capaz de reducir en mayor medida ni el crecimiento de la región cigomática ni el de las variables relacionadas con la región basal del neurocráneo, que eran las más susceptibles a ese efecto; es decir, a la intensidad de la actividad glucocorticoide correspondiente al tratamiento con ACTH, estas zonas óseas han "agotado" su capacidad para ser alteradas así como también la anchura del cráneo, representada por la variable anchura máxima del mismo, que siendo menos sensible que las otras zonas muestra también un agotamiento rápido de su plasticidad. Por el contrario, a la intensidad del tratamiento con dexametasona, las variables relacionadas con el esplanocráneo, que eran menos sensibles inicialmente, siguen respondiendo al efecto reductor.

La intensidad de la acción glucocorticoide debida al tratamiento conjunto con dexametasona y estrés provoca una reducción significativa y generalizada del crecimiento craneal, aunque sólo las variables con un margen de tolerancia más amplio muestran un efecto reductor acorde con la intensidad del tratamiento, es decir, aquéllas que no han "agotado" su tolerancia a ser reducidas. Estas variables son las relacionadas con longitudes del esplanocráneo así como con longitudes que representan la totalidad del cráneo, siendo las primeras más sensibles que éstas últimas.

Por otra parte, y en relación con las variables craneométricas, parece producirse una transición de éstas atendiendo a su susceptibilidad frente al nivel de intensidad de estos tratamientos. En consecuencia, la forma que adquiere el cráneo difiere de uno a otro tratamiento de intensidad diferente. Podríamos habernos encontrado con réplicas más pequeñas de los cráneos en los tratamientos con dexametasona que en el caso de la ACTH. Este no parece ser el caso, y así un aumento en la intensidad del tratamiento conduce también a morfologías craneales de diferente naturaleza, no como consecuencia de que los tratamientos tengan distintos efectos, sino de la correlación que se establece entre las intensidades crecientes de los mismos, y la distinta resistencia de las zonas óseas a modificar su crecimiento.

A este respecto, conviene concluir que a bajas intensidades las primeras alteraciones que se manifestarían corresponden a las del arco cigomático, seguidas de las alteraciones de las dimensiones de longitud y en último lugar de las de la anchura máxima. Pero, además, el comportamiento de las dimensiones de longitud difiere, mostrando mayor facilidad para ser alteradas las longitudes parciales que las totales; y siendo, entre las longitudes parciales, las relacionadas con el neurocráneo más sensibles que las relacionadas con el esplacnocráneo pero éstas últimas más plásticas y variables. A intensidades superiores lo que sucede es que ni la región cigomática ni el neurocráneo ni la anchura craneal son capaces de mostrar una mayor reducción de su crecimiento de acuerdo con la superior intensidad de los tratamientos mientras que sí lo hace el esplacnocráneo, que era inicialmente menos sensible. Es decir la región cigomática, el neurocráneo y la anchura craneal se caracterizan por poseer un margen de tolerancia muy estrecho mientras que el de la región del esplacnocráneo resulta ser más amplio. Respecto a que las longitudes parciales sean más susceptibles que las totales al efecto reductor de los tratamientos es obvio como consecuencia de que las primeras están contenidas en las segundas de forma que, a elevadas intensidades de acción glucocorticoide es más fácil que la diferente sensibilidad que caracteriza a las variables entre sí se exprese en la variable que las contiene ya que la generalidad de las variables en estudio responderían al efecto reductor y además lo harían en igual medida, no mostrándose dicha reducción de una forma especial sobre determinadas zonas craneales sino sobre todo el cráneo y, por lo tanto, serían las variables más representativas de la totalidad del cráneo quienes "exteriorizarían" ese efecto.

Una mayor facilidad para alterar tanto la zona cigomática en particular, como el esplacnocráneo en su conjunto, resulta también fácilmente comprensible, teniendo en cuenta, que la edad de los animales estaría comprendida en lo que podemos entender como

significativas en la morfometría y crecimiento craneal. Así desde el punto de vista preventivo, la importancia de estos efectos no estriba en su intensidad sino precisamente en el hecho de su difícil manifestación, y de que puedan verse potenciados al coincidir con otros factores. Desde el punto de vista antropológico, lo relevante deriva de que la exposición a un agente ambiental como el ruido puede estar "matizando" la morfología craneal de una población o de parte de sus individuos.

Todas estas conclusiones constituyen la respuesta a los Objetivos 3a y 3b con los que pretendíamos comprobar en el cráneo de nuestros animales posibles cambios, no sólo de carácter dimensional sino también morfológicos, en relación con la distinta actividad glucocorticoide de los tratamientos empleados. Pero, además, la discusión de estos resultados ha ido perfilando un patrón de crecimiento craneal característico de la estirpe, sexo y edad de nuestros animales ya que en la respuesta diferencial que ofrecen unas variables respecto a otras a los tratamientos, subyace la existencia de diferencias de sensibilidad de las diversas zonas o regiones craneales. Es nuestro siguiente objetivo, por lo tanto, caracterizar con precisión este patrón de crecimiento craneal a través del empleo de análisis estadísticos multivariantes y comprobar si se corroboran o no las tendencias observadas hasta el momento.

4.2. ESTADISTICA MULTIVARIANTE DE LAS VARIABLES CRANEOMETRICAS

Nuestro estudio multivariante comprende dos técnicas de análisis estadístico: el análisis de componentes principales y el análisis discriminante. Ambas técnicas aun cuando presentan un desarrollo diferente, como a continuación comprobaremos, nos van a proporcionar una gran diversidad de información permitiéndonos responder, como ya se ha comentado, a cuáles son las características del patrón de crecimiento craneal de nuestros animales, pero también a dos objetivos que no fueron inicialmente propuestos.

Así, por un lado, el discriminar qué variables craneométricas son las que caracterizan a los diferentes grupos experimentales no sólo nos indica en función de qué zonas del cráneo se define ese patrón de crecimiento, sino que además de forma indirecta nos está

señalando cuáles son las variables de esas zonas craneales, que deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar cualquier estudio, sobre alteraciones en el crecimiento de animales con iguales características que los nuestros.

De otra parte, dado que hay una discriminación de variables a favor de aquellas que proporcionan más y mejor información, se consigue una simplificación de la interpretación de los resultados. Ya vimos, cuando discutimos los datos de las variables craneométricas en el tratamiento estresante, que algunas de ellas contenían en su definición a otras de tal forma que podíamos prescindir de una información que resultaba redundante y que, en suma, dificultaba la interpretación de los datos obtenidos. Este hecho nos condujo a pensar, ya entonces, que deberíamos solventar la complejidad que supone manejar tan elevado número de variables craneométricas, sin que por ello la información que proporcionasen se viera mermada en exceso. Vemos pues como la necesidad de acudir a la estadística multivariante es una consecuencia lógica del propio transcurrir de este trabajo.

4.2.1. ANALISIS FACTORIAL: ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis factorial permitió determinar un número reducido de "factores o componentes" de modo que representasen a las variables originales, con una pérdida mínima de información. Estos factores son combinaciones de las variables craneométricas consideradas, siendo el número de factores inferior al número de variables (Bisquerra, 1989).

El punto de partida para la extracción de dichos factores es la matriz de correlación entre todas las variables que entran en el análisis, la cual aparece en la Tabla 19, si bien es necesario conocer, previamente, la adecuación de las características de la matriz a uno de los requisitos del análisis factorial. Este requisito consiste en comprobar que las variables están altamente correlacionadas. El índice Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) es uno de los indicadores del grado de asociación entre las variables y su valor para nuestra muestra fue 0.89. En el baremo para interpretar el índice KMO, este valor se clasifica como "meritorio" y, por lo tanto, señala la adecuación de la matriz para proceder al análisis factorial.

MATRIZ DE CORRELACION							
Variables	V11_12	V3_4	V4_5	V5_6	V10_12	VG_1	VA_B
V11_12	1.00000						
V3_4	.78192	1.00000					
V4_5	.82431	.74405	1.00000				
V5_6	.95120	.71380	.70190	1.00000			
V10_12	.95587	.84603	.89411	.91864	1.00000		
VG_1	.15348	.01932	.02622	.16644	.11995	1.00000	
VA_B	.93928	.79639	.86400	.90847	.96283	.15605	1.00000
VB_E	.84500	.70974	.71060	.83919	.85106	.27825	.90809
V3_12	.95114	.86128	.90691	.90582	.98938	.06161	.96157
VK_M	.89746	.71590	.80903	.86877	.88967	.07798	.92855
VK_R	.95930	.80525	.89557	.92207	.97879	.07875	.97253
VE_I	.87226	.69748	.69876	.86527	.85720	.18864	.86752
VC_I	.85628	.70818	.76524	.87389	.87768	.12835	.87905
VC_F	.77909	.78654	.82045	.67294	.83471	-.07431	.80332
VD_J	.71873	.55678	.66437	.71100	.71118	.03983	.74996
VD_E	.86832	.74743	.83010	.81682	.87749	-.03474	.88440
V1_2	.37363	.35225	.49126	.37065	.47428	-.17450	.46829
V2_3	.18658	.24318	.14682	.16472	.17496	-.32410	.15381
V7_7	.82579	.83389	.75411	.77349	.84788	-.12293	.80961
V8_8	.80356	.77224	.71322	.73733	.81041	.00692	.73164
V9_9	.48770	.55534	.46836	.43232	.56234	.40420	.46897

Tabla 19: Matriz de correlación entre las variables craneométricas.

MATRIZ DE CORRELACION							
Variables	VB_E	V3_12	VK_M	VK_R	VE_I	VC_I	VC_F
VB_E	1.00000						
V3_12	.83181	1.00000					
VK_M	.82372	.90460	1.00000				
VK_R	.85024	.98180	.92527	1.00000			
VE_I	.88966	.84200	.82029	.86050	1.00000		
VC_I	.79551	.87779	.85276	.89785	.89499	1.00000	
VC_F	.64529	.85218	.74592	.81944	.64104	.64158	1.00000
VD_J	.61348	.72455	.73903	.75533	.61489	.71997	.52350
VD_E	.67603	.89675	.83436	.90025	.68887	.80147	.78963
V1_2	.25665	.48379	.44112	.47612	.34669	.48149	.44656
V2_3	.00367	.18124	.19908	.16832	.05741	.07005	.34268
V7_7'	.63577	.87764	.76963	.85325	.73404	.76395	.86087
V8_8'	.60358	.80754	.70043	.77478	.62052	.63139	.77701
V9_9'	.40162	.51041	.33813	.44351	.38597	.37722	.50274

MATRIZ DE CORRELACION							
Variables	VD_J	VD_E	V1_2	V2_3	V7_7'	V8_8'	V9_9'
VD_J	1.00000						
VD_E	.83084	1.00000					
V1_2	.33665	.50562	1.00000				
V2_3	.09552	.27047	.08965	1.00000			
V7_7'	.57703	.81468	.49210	.32754	1.00000		
V8_8'	.46613	.71295	.39846	.33145	.81636	1.00000	
V9_9'	.20127	.43687	.23698	.19644	.48177	.56400	1.00000

Tabla 19 (Continuación): Matriz de correlación entre las variables craneométricas.

A partir de esta matriz de correlación se extrae otra, denominada matriz factorial, que reproduce la primera de forma más sencilla e indica la relación entre los factores y las variables.

La matriz que se muestra en la Tabla 20 no es la matriz factorial sino una transformación de ésta llamada matriz factorial rotada. La finalidad de esta transformación efectuada mediante rotación varimax es favorecer, una vez más, su interpretación. Como podemos observar cada una de las columnas es un factor mientras que el número de filas coincide con el número de variables. Los valores numéricos que aparecen en la Tabla 20 son los coeficientes de correlación que nos indican el peso que cada variable asigna a cada factor, de modo que aquéllas con coeficientes altos en un factor determinado se hallan asociadas a él.

La asociación de una variable a un factor se decide por el coeficiente de correlación más alto que muestre dicha variable.

Como observamos, sólo se han conservado tres factores que corresponden a aquéllos cuyos valores propios son superiores a la unidad y en consecuencia, explican el mayor porcentaje de la variabilidad total. Estos tres factores explican conjuntamente el 83% de la varianza.

Se logra así el objetivo del análisis al extraer un mínimo de factores que expliquen el máximo de la variabilidad total, es decir, al pasar de 21 variables a 3 factores sin que por ello se produzca una pérdida considerable de información.

Analicemos ahora el significado de cada uno de los tres factores. El análisis de componentes principales siempre va a extraer como factor 1 aquella asociación de variables que resuma lo mejor posible la información contenida en la matriz de datos de partida. En nuestro caso cumple esa premisa suficientemente, puesto que vemos que a él se asocian una gran mayoría de variables. Es decir, es el factor que más y mejor contribuye a explicar la variabilidad de la muestra en su conjunto (69%) y, por consiguiente, nos señala y agrupa las variables y zonas que mejor muestran los efectos de los tratamientos.

MATRIZ FACTORIAL ROTADA			
Variables craneométricas	Factor 1	Factor 2	Factor 3
A-B	.92906	.29694	.09630
K-R	.92571	.33082	.01452
3-12	.91788	.36787	.01097
C-I	.91634	.13073	.07539
K-M	.91444	.19954	.02239
11-12	.91297	.27759	.08977
5-6	.90513	.18380	.16042
10-12	.89413	.41692	.05499
E-I	.88558	.11328	.17351
B-E	.85078	.08860	.25658
D-E	.84433	.33475	-.16587
4-5	.78139	.44484	-.07261
D-J	.77673	-.03256	-.10592
7-7'	.75255	.50004	-.22757
3-4	.73074	.44850	.05995
C-F	.68622	.58214	-.13641
1-2	.50917	.09368	-.19581
9-9'	.19079	.85991	.29340
8-8'	.62429	.63915	-.08316
2-3	-.05564	.62242	-.53576
G-1	.04765	.08694	.94267

Tabla 20: Matriz factorial rotada.

La asociación de una variable a un factor se decide por el coeficiente de correlación más alto que muestre dicha variable.

Generalmente el análisis extrae por orden de importancia al factor 2 (8%) y, por último, a aquél que se asocia con la menor variabilidad de la muestra (6%) y que corresponde al factor 3.

Aunque posteriormente discutiremos con detalle la asociación de las variables a cada factor y su significado, sí podemos ahora resumir que el amplio conjunto de medidas correlacionadas con el factor 1 agrupan, por un lado, a las representativas de la dimensión longitudinal del cráneo, sin discriminar neuro y esplanocráneo, y por otra parte, a las variables que integran la arcada cigomática. Al factor 2 parecen asociarse mayoritariamente variables que representan la anchura del cráneo y el tercer factor está representado exclusivamente por la longitud del hueso supraoccipital.

Una buena fórmula de analizar estos resultados es acudir a la representación gráfica que aparece en la Figura 20 a, b y c. En ella los factores extraídos están representados por los ejes de coordenadas.

La extracción de tres factores, que representan a la práctica totalidad de la variabilidad muestral, implica la dispersión de los valores unifactoriales en un espacio vectorial de tres dimensiones y, por lo tanto, son tres los ejes dimensionales relacionados con los factores. La dificultad de plasmar esta idea en un plano hace que la Figura 20 contenga tres representaciones distintas que surgen de la combinación de los tres factores dos a dos.

Sobre los ejes, que representan a los respectivos factores en cada caso, se han proyectado las variables de partida cuyas coordenadas, que las sitúan respecto a cada eje, vienen dadas por los correspondientes coeficientes de correlación que aparecían en la Tabla 20.

En esta representación, además de la proyección individual de las variables, aparecen los individuos de todos los grupos en función de los valores que obtienen para las variables asociadas a cada factor. Así, la posición relativa de los individuos está condicionada por la posición de las variables.

Como apreciamos, las variables craneométricas con pesos elevados para el mismo factor aparecen agrupadas y son ellas las que permiten caracterizar y establecer diferencias entre los grupos de individuos.

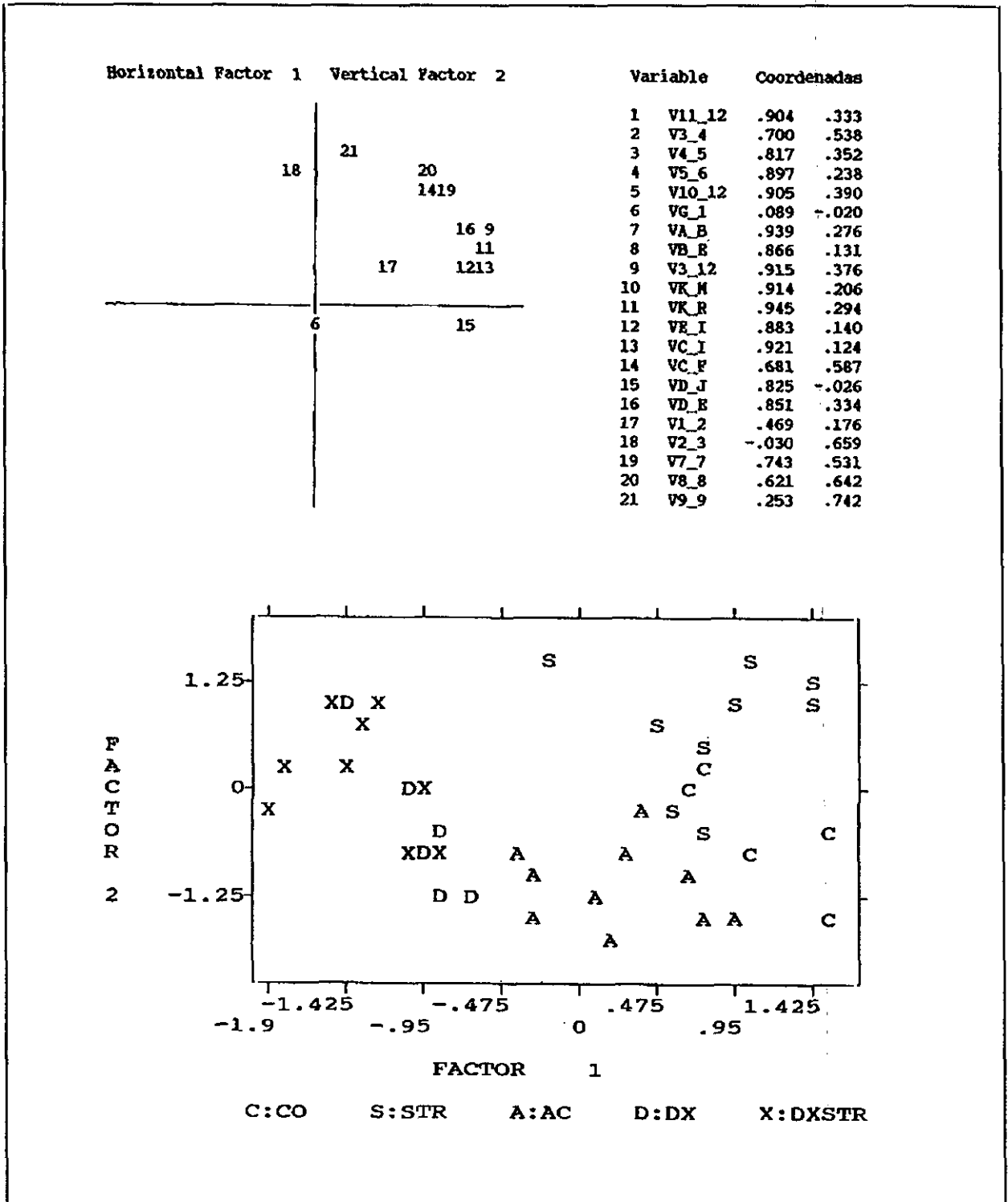


Figura 20 a: Representación gráfica de la combinación de factores.

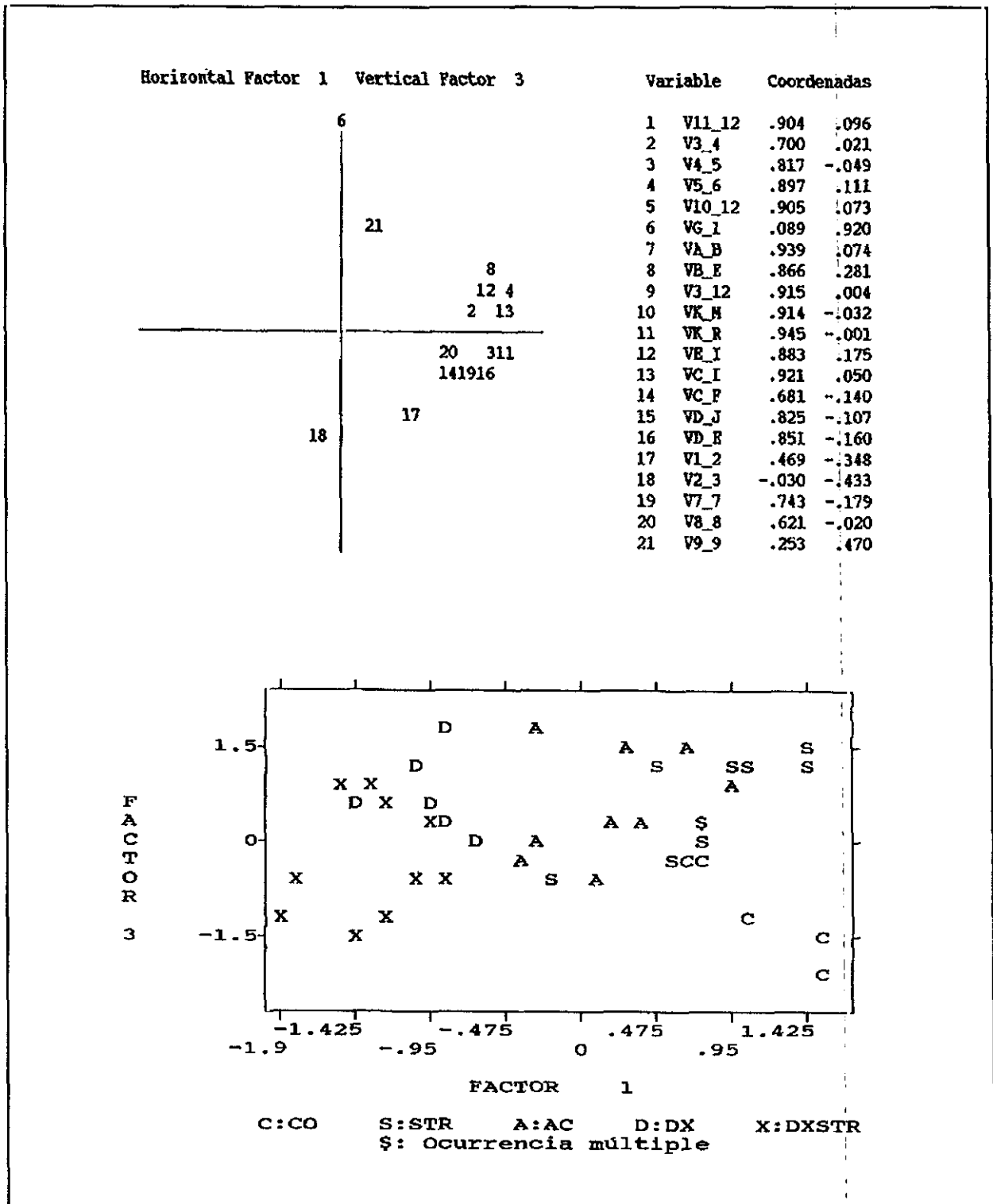


Figura 20 b: Representación gráfica de la combinación de factores.

Horizontal Factor 2	Vertical Factor 3	Variable	Coordenadas	
6		1 V11_12	.333	.096
		2 V3_4	.538	.021
		3 V4_5	.352	-.049
		4 V5_6	.238	.111
		5 V10_12	.390	.073
	21	6 VG_1	-.020	.920
		7 VA_B	.276	.074
	8	8 VB_E	.131	.281
	12 4	9 V3_12	.376	.004
	13 7 1 5 2	10 VK_M	.206	-.032
		11 VK_R	.294	-.001
	10 11 20	12 VE_I	.140	.175
15	16 19	13 VC_I	.124	.050
		14 VC_F	.587	-.140
	17	15 VD_J	-.026	-.107
		16 VD_E	.334	-.160
	18	17 V1_2	.176	-.348
		18 V2_3	.659	-.433
		19 V7_7	.531	-.179
		20 V8_8	.642	-.020
		21 V9_9	.742	.470

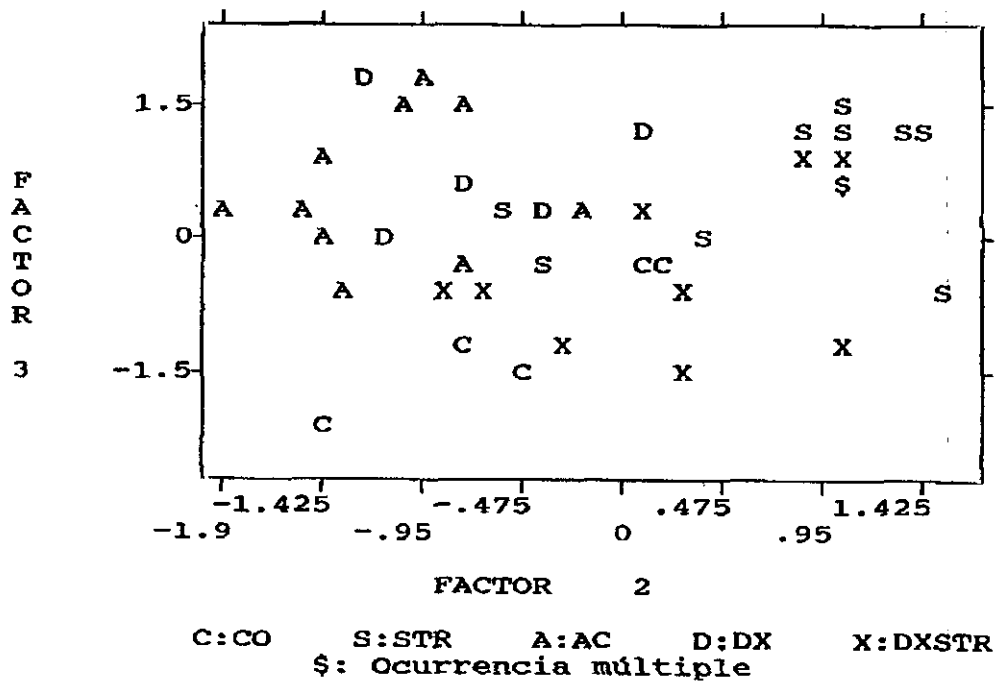


Figura 20 c: Representación gráfica de la combinación de factores.

Lo primero que resulta interesante discutir es el criterio por el cual las diferentes variables se asocian a cada uno de los tres factores determinados por el análisis de componentes principales.

Como ya se ha comentado, un número considerable de variables, diecisiete, asignan un peso mayor al factor 1. Dichas variables se pueden clasificar en dos grupos. Las correspondientes a la zona cigomática y aquellas que representan la dimensión longitudinal del cráneo que, lógicamente, es la dimensión definida con más frecuencia.

El que dichas variables estén asociadas con el factor que mejor representa la variabilidad muestral significa que los efectos de los tratamientos se centran de forma especial en ellas y en las zonas que representan.

Por lo tanto, desde el análisis multivariante, encontramos un apoyo sustancial a las tesis que establecían a la arcada cigomática (perteneciente al esplanocráneo) y al crecimiento en longitud como la zona más modificable del cráneo y como el proceso que más caracteriza al patrón de crecimiento craneal de estos animales, respectivamente. Por ello, arco cigomático, como región anatómica, y longitud, en cuanto a dimensión craneal, reúnen las variables que muestran con mayor significación los efectos graduales de una acción glucocorticoide creciente a esta edad y sexo de los animales.

Evidentemente ello ocurre porque, en el periodo de vida puberal-juvenil al que corresponde la edad de las ratas utilizadas, el arco cigomático y la longitud del cráneo deben ser dos componentes cuyo crecimiento no se ha estabilizado y van a mostrar un desarrollo importante durante ese tiempo, permitiendo así que un agente externo les afecte.

El siguiente factor que representa la variabilidad muestral (factor 2) confiere un peso considerablemente menor a la misma y sólo tres variables se asocian a él. Una de estas tres variables corresponde a aquella que representa la anchura por excelencia o anchura máxima del cráneo (8-8'). Ciertamente, de las ya pocas variables representativas de la dimensión "anchura", ésta era la única que sufría algún cambio por efecto de la actividad glucocorticoide. Así, las alteraciones de esta variable en función de la intensidad de los tratamientos mostraron, con el análisis univariante, que se producían a una cierta intensidad, eran de pequeña magnitud y se estabilizaban rápidamente. Es decir, de acuerdo con la

nomenclatura utilizada por nosotros, era una variable poco sensible a la acción glucocorticoide en esta edad y presentaba un margen de saturación del efecto reductor poco amplio.

Esos resultados del análisis univariante nos conducían a la tesis de una estabilización del crecimiento en anchura del cráneo de la rata en este periodo de edad.

Esta tesis queda ahora reforzada por la asociación con el factor 2 de la variable antes citada, junto con la anchura interorbitaria, permitiéndonos pensar que la identidad del factor 2 consiste en representar la dimensión "anchura" del cráneo. Esta dimensión, al ser menos susceptible de ser alterada, evidentemente explica en términos de variabilidad, y por consiguiente de efectos de los tratamientos, muy pocas alteraciones.

En un principio, la asociación en el factor 2 de estas dos variables y una tercera, altura del *foramen magnum*, nos produjo confusión. Sobre todo teniendo en cuenta que la anchura interorbitaria y la altura del *foramen magnum* se nos mostraban, en el análisis univariante, como variables tan resistentes a las acciones reductoras de los glucocorticoides que habían sido incluidas, en nuestra discusión, en una agrupación artificial cuyo denominador común era la incapacidad de alterarse.

Ciertamente, si recordamos, la tercera de las llamadas variables "resistentes" era la longitud del hueso supraoccipital y, como vemos, es la única variable asociada con el factor 3.

Por lo tanto, de nuestras ideas preestablecidas en el análisis unifactorial, hubiésemos esperado una asociación en el factor 3 de las tres variables no alteradas.

Sin embargo, hemos mencionado que la agrupación de estas variables realizada por nosotros resulta artificial, ya que las mismas nada tienen en común desde una perspectiva anatómica, funcional o dimensional. En aquel momento expresamos una posible explicación biológica para el hecho de que estas variables tuvieran la necesidad de mostrarse muy estables en este periodo en que el desarrollo del animal ha alcanzado madurez. Sin embargo, el análisis de componentes principales nos permite, sin que ello reste validez a tales explicaciones, ordenar mejor estas variables de acuerdo con la tendencia de la zona anatómica

del cráneo que representan frente a la acción reductora de los glucocorticoides, y por consiguiente frente a la variabilidad muestral.

De este modo queda claro que el factor 2 representa mayoritariamente la dimensión "anchura" del cráneo y asocia entre sí variables que representan dicha dimensión y/o que muestran una afectación similar.

Si aceptamos que el crecimiento en anchura es muy estable en los animales de esta edad, es razonable que los tratamientos precisen de un cierto grado de intensidad para provocar efectos, y que estos sean de pequeña magnitud sobre algunas variables de anchura e, incluso, que algunas de éstas ni siquiera muestren alteraciones significativas (anchura interorbitaria).

Desde esta perspectiva nos planteamos una nueva posibilidad. La variable altura del *foramen magnum* parece compartir identidad con las variables de anchura que como ella se asocian al factor 2. Nos preguntamos si, siendo una de las dos únicas variables que representan la dimensión "altura" en el cráneo, no será este resultado indicativo de un comportamiento común de las dimensiones de "anchura" y "altura" frente a los tratamientos. Evidentemente al ser pocas las variables identificadas con esa dimensión no hay suficiente información para asegurarlo. La otra variable representativa de la altura es la altura exoccipital (1-2), asociada al factor 1 aunque con el coeficiente más bajo de todas las variables.

Volviendo nuevamente a la identidad de los factores, observamos que la tercera variable "resistente" (longitud del hueso supraoccipital) es la única asociada con el factor 3 que, por otra parte, es el que menos porcentaje explica de la variabilidad muestral. Luego, ello demuestra que una de las características que definen los efectos de los tratamientos es la incapacidad de alteración de esta medida del hueso supraoccipital y, en cualquier caso, es la característica de menos peso. A continuación le sigue, con una relevancia intermedia, la estabilización de la dimensión de "anchura" (y quizás "altura") del cráneo (factor 2). La "anchura" sufrirá alteraciones sólo si la intensidad de acción glucocorticoide es adecuada, dichas alteraciones serán de pequeña magnitud y afectarán a unas variables de anchura, sin

apreciarse los efectos en otras.

Por último, la característica más relevante (factor 1) es la notable acción reductora del crecimiento del cráneo en longitud así como de las variables que integran el arco cigomático.

De todo lo expuesto, podríamos decir que el patrón de crecimiento craneal de la rata púber supone una estabilización del crecimiento en anchura y posiblemente en altura, mientras que el crecimiento longitudinal es el proceso que confiere mayor plasticidad al cráneo de estos animales. El arco cigomático sigue mostrándose como una región anatómica donde dicha plasticidad se resalta más.

Una vez conocido el significado de los factores resulta más sencillo discutir la información procedente de su representación gráfica (Figura 20).

En primer lugar centraremos nuestra atención en la posición relativa de los individuos de los diferentes grupos, lo que permitirá relacionar a los animales de un mismo grupo, separándoles de los restantes en función de los factores extraídos por el ACP. Es decir, al analizar la posición relativa asumida por los individuos frente a los factores, podemos ver si hay una agrupación de los mismos que nos posicione a cada grupo separado de los demás, de acuerdo con el efecto o tendencia que cada animal muestra para las variables representadas por los factores.

De esta manera, al eliminar el "ruido de fondo" producido por el exceso de variables agrupándolas en los factores, podremos diferenciar mejor aquellos grupos cuyos resultados eran próximos, y averiguar si los animales asignados a ellos forman parte de grupos diferentes o, por el contrario, se confunden en un mismo grupo.

Esta posibilidad resulta especialmente importante para nosotros en el caso del grupo de animales expuestos al ruido, en los que muchas veces los efectos no llegan a manifestarse estadísticamente, pero se encuentran en el límite de la significación.

Iniciemos la discusión de esta parte por la representación gráfica que enfrenta al factor 1 con el factor 2. Si hacemos un bandeo o barrido de la imagen desde la

derecha a la izquierda, estamos analizando la distribución espacial de los animales de los respectivos grupos de acuerdo con el vector que representa al factor 1.

Lo primero que observamos es una distribución acorde con la intensidad de acción glucocorticoide asociada a cada tratamiento, demostrando nuevamente una graduación o polaridad de los efectos representados por el factor 1 frente a la misma. En consonancia con esto último se pueden establecer cinco bandas verticales que tienen cada una su eje central horizontal en el factor 1. Dos de ellas, situadas más a la izquierda, señalarían los animales en los que los efectos sobre lo representado por el factor 1 alcanza un valor menor. Es decir, en los que los efectos reductores de la longitud del cráneo y del arco cigomático son mayores. Hay una banda central muy amplia que engloba a los animales que muestran unos efectos intermedios y dos bandas a la derecha que representarían los efectos menores o los animales que al no ser afectados presentan cráneos más largos y con un arco cigomático más desarrollado.

A continuación analizamos paso a paso la distribución de los individuos que aparecen en estas bandas. Los animales que se sitúan más a la izquierda son los tratados con dexametasona y ruido, seguidos de una banda bien delimitada en la que se entremezclan animales de los grupos DxStr y Dx. Por lo tanto, los animales sometidos a una actividad glucocorticoide mayor se localizan muy próximos entre sí en las dos bandas que corresponden con los valores más bajos de las variables asociadas al factor 1. Es decir, a mayor intensidad de la actividad glucocorticoide mayor efecto reductor sobre el crecimiento en longitud y mayor alteración aparente del arco cigomático.

Evidentemente debe existir una banda de transición de menor a mayor efecto reductor (segunda banda por la izquierda), en la que los animales de los dos grupos tratados con dexametasona se distribuyen mezclados, ya que, el nivel de acción glucocorticoide que representan lo marca la propia dexametasona, y la diferencia que confiere la hipersecreción de corticosterona provocada por el estrés es comparativamente menor. Sin embargo, dicha diferencia, es suficiente para que aproximadamente más del 60% de los animales DxStr se destaquen de los tratados sólo con dexametasona por mostrar efectos reductores del crecimiento craneal mayores (posición extrema a la izquierda). El resto (menos del 40%) se comportan de una forma similar a los tratados únicamente con dexametasona.

A continuación, y justo en torno al eje vertical central, nos encontramos la banda intermedia a la que hemos hecho referencia anteriormente. Su simbolismo es claro y no lo vamos a repetir, coincidiendo con el mismo, vemos que esta banda está ocupada por los animales administrados con ACTH, es decir por el grupo experimental que presenta una actividad glucocorticoide intermedia entre los tratamientos con dexametasona y los animales estresados o controles. Por consiguiente, a una actividad glucocorticoide media le corresponde unos efectos sobre el crecimiento craneal medios.

Pasamos ahora al análisis de los animales que se sitúan más a la derecha y que, por lo tanto, muestran los valores más altos para los efectos asociados al factor 1. Evidentemente esta posición coincide con los animales cuya actividad glucocorticoide es menor, y por ello, nos encontramos con animales controles (actividad glucocorticoide basal) y con animales expuestos al ruido (actividad glucocorticoide moderada). También era esperable encontrarnos a los animales estresados entremezclados con los controles a razón de los resultados univariantes discutidos. Sin embargo cabe preguntarse ¿significa este hecho que los animales expuestos al ruido y los controles forman un mismo grupo indiferenciable?. El análisis multivariante nos va a permitir extraer información para la diferenciación en el comportamiento de ambos grupos.

Lo primero que destaca al observar en la Figura 20 la distribución de los animales estresados es su notable dispersión. Es cierto que dicho comportamiento también se evidencia en los controles pero, en el caso de los animales del grupo Str, la dispersión es más acusada, tanto en la dirección del factor 1 (horizontal), que estamos analizando, como en la dirección señalada por el factor 2 (vertical).

Hay dos aspectos distintos a discutir en relación a la dispersión de los animales estresados. Por un lado el motivo o causa de la dispersión, pero también podemos analizar que la dispersión distribuye a los animales no azarosamente, sino formando subgrupos entre los cuales alguno es mayoritario y, por lo tanto, representativo del efecto debido a la exposición al ruido.

Vamos en primer lugar a abordar este último aspecto, ya que va a ser el que nos permita establecer las diferencias entre los grupos control y estrés. La dispersión de los animales expuestos al ruido les hace distribuirse en las tres bandas que se suceden de

derecha a izquierda y que nos señalan la ausencia, moderación y nivel medio de los efectos reductores del crecimiento craneal. Esto último representado por la banda dispuesta en el centro, ya comentada anteriormente, y ocupada por el tratamiento con ACTH.

El análisis de la distribución de los animales del grupo estrés en estas tres bandas es como sigue. Un 22.2% de animales estresados aparecen en la primera banda de la derecha correspondiente a los cráneos más largos y/o con arco cigomático más desarrollado, compartiendo esta posición con el 62.5% de los controles.

Sin embargo el 66.7%, es decir, la mayoría de los animales expuestos al ruido, están en la segunda banda de la derecha que denota ya cráneos más próximos a los de los animales tratados con ACTH. La posición mayoritaria de animales estresados en esta banda se comparte con un 37.5% de los controles pero, asimismo, con alguno de los animales del grupo Ac, aquéllos cuya reducción longitudinal del cráneo o del arco cigomático resultó menor.

Por lo tanto esta segunda banda de la derecha parece corresponder nuevamente a una zona de transición entre la ausencia de efectos y el efecto de la ACTH. Es decir, entre la banda más a la derecha ocupada mayoritariamente (62.5%) por los controles y aquella que situada a la izquierda, en el centro de la representación, indica los efectos mediados por la ACTH.

Desde esta perspectiva la ocupación mayoritaria (66.7%) de esta banda de transición precisamente por los animales estresados es lógica, ya que presentan una actividad glucocorticoide mediada por una moderada hipersecreción de corticosterona y, por consiguiente, también efectos moderados sobre el cráneo. Razonable es asimismo la presencia minoritaria en esta banda de transición de animales en los que el efecto reductor del tratamiento con ACTH fue menor.

En último lugar un 11.1% de los animales expuestos al ruido mostró un efecto reductor del cráneo que lo incluye en la banda ocupada casi exclusivamente por el grueso de animales tratados con ACTH.

En cuanto al motivo de la dispersión de los animales estresados, su análisis es indicativo también de aspectos interesantes.

Los fisiólogos estamos acostumbrados a que muchos parámetros evaluados presenten márgenes amplios de normalidad, por lo que, la propia individualidad de los sujetos de estudio hace que en un mismo grupo se produzca una dispersión de los resultados. A pesar de la estabilidad genética de las estirpes utilizadas en la investigación, esta individualidad en el comportamiento de muchos parámetros, y por consiguiente la dispersión de los valores alcanzados por los mismos, se manifiesta habitualmente sobre todo en los animales control. Sin embargo, en los grupos expuestos a un tratamiento, la dispersión suele ser contrarrestada por el efecto común debido al mismo y desaparece en mayor o menor medida cuanto más intenso es el efecto.

En nuestro caso, al ser los efectos de la exposición al ruido moderados, podríamos encontrar todavía una tendencia a la dispersión de los datos, similar a la que aparece en los animales control, pero lo llamativo es que la dispersión sea incluso muy superior a la manifestada por los mismos.

Una explicación para un comportamiento de esta naturaleza en animales sujetos a un tratamiento es que dicho tratamiento contenga estímulos que provoquen sobre las variables en estudio efectos contrapuestos.

Teniendo en cuenta las variables que definen al factor, los animales estresados parecen estar sujetos a moderados efectos reductores de dichas variables ocasionados por la moderada acción glucocorticoide de la corticosterona circulante estimulada por el estrés, pero también podrían estar sujetos a factores que aumentasen la magnitud de las variables consideradas. En efecto, nosotros sabemos por los resultados significativos de la estadística univariante, que los animales de este grupo muestran un reforzamiento de zonas de inserción muscular occipital lo cual, obviamente, aumenta los valores de ciertas medidas de longitud contenidas en el factor 1. Además sospechamos que en ellos también se iniciaban, de una forma moderada, los efectos reductores del crecimiento craneal mediados por el exceso de glucocorticoides, señalando mediante reducciones no significativas de las variables y, sobre todo, por los cambios significativos de alguno de los índices analizados, precisamente a las longitudes del cráneo y a la arcada cigomática como las zonas vulnerables del mismo donde se iniciaban dichos efectos. Hay dos consecuencias claras de lo expuesto. En primer lugar, la dispersión encontrada nos indica el mayor o menor grado que cada individuo muestra de uno u

otro efecto. En segundo término, la ausencia de significación estadística en los animales estresados no es sólo consecuencia de lo moderado de los efectos sino también de que, sobre muchas variables, los efectos reductores del crecimiento y los efectos de reforzamiento del complejo occipital se contrarrestan, no manifestándose significativamente ni unos ni otros.

Esta notable dispersión de las medidas craneales en los animales estresados se evidencia no sólo en relación al factor 1, lo cual es indudablemente más relevante por ser el representativo de los efectos más significativos de la actividad glucocorticoide, sino también frente al factor 2. Pudiendo en este caso ser consecuencia exclusivamente de la constancia de la anchura frente a los tratamientos.

Vamos a continuación a analizar la distribución espacial de los animales de acuerdo con el vector que representa el factor 2. Consistiría en hacer un barrido de la misma representación gráfica en sentido vertical. Este barrido supone, teniendo en cuenta los efectos asociados a dicho factor, que los animales con cráneos más anchos se distribuirán en la zona superior de la representación y los restantes se irán situando gradualmente de arriba hacia abajo en la medida en que los efectos reductores sobre la dimensión "anchura" se intensifican.

El primer resultado de este análisis es que no existe una ordenación, en relación con la intensidad de acción glucocorticoide, tan clara como en el caso del factor 1.

Ciertamente no encontramos una distribución de los individuos tratados tal que los animales con actividad glucocorticoide basal o moderada (controles y estresados) se sitúen en bandas superiores y seguidamente se manifieste una polaridad. Por el contrario, observamos que la dispersión es una norma general en todos los grupos. A excepción sólo del tratamiento con ACTH, los animales de los restantes grupos experimentales se localizan dentro de la banda que les marca el factor 1 pero con una notable dispersión en el sentido vertical.

De esta manera y con independencia de que el efecto reductor sobre la longitud del cráneo o sobre el arco cigomático sea moderado (Str) o intenso (Dx y DxStr) nos encontramos con animales de cráneos anchos y estrechos en todos los grupos. Tan sólo en los animales tratados con ACTH se muestra una clara agrupación indicativa de una tendencia homogénea a la reducción del crecimiento en anchura.

¿Qué interpretación podemos hacer de estos resultados?. La información necesaria la tenemos en el significado, ya discutido, de este factor 2 y en el comportamiento de las variables asociadas en él frente a la actividad de los glucocorticoides.

En efecto, el factor 2 representa los efectos sobre la anchura del cráneo y ésta muestra una notable estabilización de su crecimiento en estos animales, ya que los efectos reductores de la actividad glucocorticoide se dejan sentir poco o nada sobre las variables implicadas. Por lo tanto, los efectos reductores sobre la anchura craneal son de orden secundario respecto a los involucrados en el factor 1, lo cual coincide con la asociación de estas variables de anchura en el segundo factor en importancia del ACP.

La estabilidad de la anchura craneal de estos animales no sólo se manifiesta por el hecho de que tan sólo una de las variables muestre reducciones significativas en la estadística univariante, también se deduce de que el efecto reductor sobre esa variable, que aparece precisamente en los animales tratados con ACTH, alcanza su máximo exponente en ellos mismos. Es decir, la intensidad de tratamiento necesaria para conseguir dicho efecto es la correspondiente a la administración de ACTH, pero tampoco ese efecto reductor aumenta a intensidades mayores de actividad glucocorticoide (tratamientos con dexametasona).

Partiendo de esta información se explica perfectamente la distribución de los animales tratados que establece el vector espacial del factor 2.

Primero, la ausencia de polaridad de los valores adquiridos por la anchura del cráneo desde una menor a mayor intensidad de actividad glucocorticoide. Segundo, los animales pertenecientes a un mismo grupo manifiestan su individualidad frente a variables que, al no estar supeditadas a un efecto común importante, no muestran una tendencia homogénea. Como consecuencia de esto último todos los grupos presentan una notable dispersión con una distribución azarosa entre cráneos anchos y estrechos.

Por último, también se explica que el único tratamiento en el que todos los animales se agrupan corresponda con la administración de ACTH, indicando que todos los animales destacan por mostrar una reducción de la anchura craneal. Obviamente esto es así porque ese tratamiento representa la actividad glucocorticoide suficiente para provocar un

efecto reductor de la anchura pero éste queda ya saturado en dichos animales y no se intensifica por los tratamientos con dexametasona, cuyos individuos manifiestan nuevamente una dispersión en relación a esta dimensión.

Estos resultados dejan claro de nuevo que lo más característico de los efectos sobre el crecimiento del cráneo que estamos estudiando, no son las alteraciones de la anchura y que, por lo tanto, no es una buena dimensión para caracterizar e identificar tratamientos que alteren el crecimiento craneal a esta edad y sexo de los animales. El factor 2 no nos permite pues delimitar tratamientos con mayor o menor efecto reductor sobre el cráneo.

Respecto a la representación gráfica que enfrenta a los factores 1 y 3, observamos que los individuos se distribuyen en la dirección del factor 1 en cinco bandas atendiendo al mismo criterio que ya hemos discutido. Recordemos, de izquierda a derecha, una banda donde se sitúan mayoritariamente los animales del grupo DxStr seguida de una banda de transición ocupada por animales de los grupos DxStr y Dx, aunque predominando estos últimos. A continuación, una amplia zona correspondiente a los animales tratados con ACTH para pasar, de nuevo, a una zona de transición donde, en este caso, los individuos que se entremezclan pertenecen a los grupos estrés y control. Por último, la banda más a la derecha mayoritariamente ocupada por los animales controles.

Nada novedoso nos proporciona pues el análisis de esta representación respecto a lo ya dicho desde el punto de vista del factor 1, sin embargo sí resulta relevante la agudización de la dispersión de los animales cuando observamos la distribución de los mismos en la dirección que marca el factor 3. Es decir, cuando el bandeo se realiza desde la zona superior hacia la inferior de la gráfica. Haciéndolo así vemos que en todos los grupos, incluido el grupo Ac, nos encontramos animales que adquieren tanto valores altos como bajos para la variable longitud del hueso supraoccipital que es la única asociada al factor 3. Esta variable representa una zona del cráneo cuyo crecimiento se encuentra fuertemente estabilizado a esta edad de los animales y, por consiguiente, la variabilidad de los valores que para ella muestran los animales debe ser considerada como una expresión de su propia individualidad y no como un efecto de los tratamientos.

En relación a la representación gráfica de los factores 2 y 3, no tiene

sentido realizar un análisis profundo ya que en ella se aunan los factores que menor porcentaje de la variabilidad muestral explican y, por consiguiente, representan los efectos de menor peso sobre el crecimiento craneal. En los casos anteriores, la asociación de estos factores con el factor 1 permitía matizar la información procedente de la distribución de los animales en función de los efectos sobre la longitud craneal o sobre el arco cigomático. En el caso que ahora nos atañe, como podemos ver en la gráfica, no hay ningún criterio que ordene la disposición de los individuos y además su dispersión es manifiesta. Esta observación es lógica ya que estos factores asocian, por un lado, variables poco susceptibles a los efectos reductores de los tratamientos y, por otro, incluso muy resistentes, de modo que la posición de los animales en esta gráfica no nos permite, como ya esperábamos, diferenciar los grupos atendiendo al efecto de los tratamientos. Si estos factores 2 y 3 mostraban, en su combinación con el factor 1, una dispersión de la respuesta de los animales, es razonable esperar mayor dispersión aún cuando se combinan entre sí.

En resumen, la información que el análisis de componentes principales nos ofrece acerca del patrón de crecimiento de nuestros animales confirma que la arcada cigomática, como zona craneal, y la longitud, como dimensión, son más susceptibles a ser alterados en su crecimiento, mientras que las zonas resistentes guardan relación con la anchura (quizás también altura) del cráneo y, de forma más acentuada, con el hueso supraoccipital.

A la vista de este patrón de crecimiento, el ACP nos proporciona la posibilidad de caracterizar y diferenciar entre sí los distintos grupos de tratamiento en función de los efectos indicados por el factor 1, que es el que agrupa esas variables representativas de las zonas del cráneo más sensibles. Pero, además, nos está señalando la forma en que deberíamos diseñar futuros trabajos de esta naturaleza para que, sin que perdamos información relevante, ganemos en simplicidad. Este objetivo no era uno de los inicialmente propuestos, sin embargo la aplicación del ACP nos permite de forma indirecta responder al mismo.

Como podemos observar, la contribución de cada variable a cada uno de los tres factores determinados por el análisis nos está indicando que dichos estudios deben "abordarse" por zonas o áreas craneales, no arbitrarias, sino caracterizadas, como ya hemos discutido, por su diferente susceptibilidad a los efectos reductores que sobre su crecimiento causan nuestros tratamientos.

Dado que las diferencias de sensibilidad de las diversas zonas del cráneo es algo característico del patrón de crecimiento craneal, y éste lo es a su vez de la estirpe, sexo y edad, está claro que estos resultados nos permiten, como hemos dicho, diseñar cualquier estudio sobre alteraciones de crecimiento en animales que reúnan estas características, sea cual sea el elemento modificador del crecimiento que se estudie pero, con mayor seguridad, si el mecanismo intermediario entre el elemento considerado y el crecimiento es la actividad glucocorticoide.

Por lo tanto, a la hora de evaluar en animales con esos requisitos el efecto sobre el crecimiento craneal de dichos tratamientos debemos centrar nuestra atención en las variables craneométricas representativas de la dimensión longitud del cráneo así como del arco cigomático, por ser éstas las zonas craneales cuyo crecimiento a la edad de estos animales aún no se ha estabilizado y, por consiguiente, es más susceptible de ser afectado por tratamientos de los que se sospeche acciones sobre el crecimiento.

Obviamente no sería práctico considerar las variables que definen la dimensión "anchura", y probablemente la dimensión "altura", pues el análisis de componentes principales no las señala como significativas a la hora de diferenciar entre sí los grupos de animales atendiendo a los efectos reductores de nuestros tratamientos sobre el crecimiento craneal. Sin embargo, de interesar comprobar efectos sobre la anchura o la altura debería elegirse para facilitar el trabajo, de entre las variables por nosotros consideradas, la anchura máxima del cráneo (8-8') y la altura exoccipital (1-2) respectivamente, que se han mostrado como las variables con una cierta capacidad de cambio representativas de esas dimensiones.

También resultarían descartadas de esos futuros estudios las variables altamente resistentes a que su crecimiento resulte alterado (longitud del hueso supraoccipital) pues, precisamente por esa característica, no permitirían que evaluáramos un efecto reductor sobre el crecimiento del cráneo.

Vemos así que el diseño de futuros trabajos de este tipo resulta facilitado no sólo porque responderá a un criterio conocido de antemano, el de la diferente susceptibilidad que presentan las distintas zonas craneales, sino porque además se produce una considerable reducción del número de variables a tener en cuenta. El ACP nos permite así cumplir otro de los objetivos que no fueron planteados en un principio pero que surgió en el

transcurso de la discusión del estudio univariante. Y lo hace al agruparnos las variables craneométricas consideradas en los tres factores que conjuntamente explican el mayor porcentaje de la variabilidad muestral.

Nuestro estudio multivariante comprende otra técnica de análisis estadístico: el análisis discriminante. Este análisis implica en su desarrollo una auténtica selección de variables entre todas las de partida. Esas variables van a ser las que mejor discriminen unos grupos de otros. En el caso del ACP, se mantienen todas las variables y lo que sucede es que se distribuyen en tres factores que "recogen" la información que cada una de ellas contiene. Las dos técnicas reducen así el número de variables sin que se pierda información relevante.

A partir de esa selección de variables, el análisis discriminante proporciona ecuaciones matemáticas, algo que no hace el ACP, las cuales no sólo nos facilitarán conocer si realmente esas variables específicas permiten discriminar nuestros grupos, sino también si individuos con unas mismas características de estirpe, sexo, edad y patrón de crecimiento craneal que los nuestros, y expuestos a tratamientos de los que se intuya efectos sobre el crecimiento, pueden o no asignarse a uno de nuestros cinco grupos de tratamiento en función de la intensidad de acción glucocorticoide por ellos representada. Dicha clasificación requiere únicamente conocer el valor que cada animal presenta para cada una de las variables seleccionadas por el análisis.

Obviamente la selección de variables previa a la obtención de las ecuaciones comentadas nos ofrece, desde ese mismo momento, información referente a la caracterización del patrón de crecimiento craneal de nuestros animales fijándonos si dichas variables se relacionan con determinadas zonas del cráneo que muestran diferente sensibilidad a modificar su crecimiento.

Ambas técnicas, como vemos, difieren en determinados aspectos de su desarrollo pero nos ofrecen información convergente a la hora de responder al objetivo 3c.

Vamos, por consiguiente, a tratar a continuación con más detenimiento el desarrollo del análisis discriminante y a discutir los resultados obtenidos.

4.2.2. ANALISIS DISCRIMINANTE

Este análisis seleccionó cinco funciones matemáticas con las que clasificar de forma inequívoca cada individuo tomado al azar en uno de los cinco grupos experimentales considerados. Estas funciones discriminantes son combinaciones lineales de trece de las veintiuna variables craneométricas de partida por ser éstas las que más contribuyen a discriminar entre los grupos y, por lo tanto, son las características craneales determinadas por los efectos de estos tratamientos sobre tales variables las que condicionan esta clasificación.

La selección de cada una de estas trece variables se realizó atendiendo al criterio de la D2 de Mahalanobis, mediante el cual se selecciona aquella que maximiza la distancia de Mahalanobis entre los dos grupos más próximos. Siguiendo este criterio, las variables fueron seleccionadas "paso a paso", de tal modo que entrasen en el análisis las variables que contribuyeran más a la discriminación entre los grupos. Se especificó que dicha contribución fuese significativa al menos en un 5% así como que el valor de tolerancia admitido fuera de 0.001, de modo que si una variable fuese combinación de otras no entrase en la función discriminante.

Conocidas las combinaciones lineales de variables se estiman los coeficientes de cada una de las funciones de clasificación obtenidas. Estos coeficientes aparecen en la Tabla 21. La última columna corresponde a los valores de la D2 de Mahalanobis, indicando el orden de entrada de cada variable en el análisis.

Una vez conocidos estos coeficientes, es posible calcular unos valores de clasificación que nos permitirán distinguir entre los grupos experimentales cuando en las ecuaciones matemáticas se sustituyen dichos coeficientes así como los valores que adquieren las 13 variables craneométricas en cada individuo. De este modo, un individuo pertenece a aquel grupo de tratamiento para cuya función o ecuación de clasificación ha alcanzado el valor de clasificación más elevado. Se obtiene así una regla matemática que asigna a los individuos en uno de los cinco grupos de tratamiento.

COEFICIENTES DE CLASIFICACION						
Variable craneométrica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Distancia D2
	Co	Str	Ac	Dx	DxStr	
10-12	-7.807552	46.06878	11.99279	27.42153	14.86687	0.71
3-12	-49.57920	-59.48621	-73.47484	-73.37417	-56.90607	2.63
A-B	-28.58263	-62.09682	-21.25592	-21.94207	-28.45843	3.62
C-F	-25.73193	-30.91523	-38.31358	-41.33243	-31.27322	4.92
K-M	250.3795	237.1140	244.3498	215.2883	214.0500	6.81
3-4	186.5514	196.7824	133.4063	109.9536	145.6194	9.90
2-3	130.6477	111.6683	156.5303	172.8208	146.0964	12.63
G-1	48.54650	58.38233	63.46573	72.82399	59.49281	17.55
5-6	142.0524	129.2118	132.0939	114.8989	124.9725	19.08
B-E	51.14529	57.62013	67.28055	67.90657	56.36824	21.36
1-2	316.4454	328.3361	304.2696	300.9342	297.5069	23.28
E-I	59.11360	80.96513	38.91967	41.38152	50.24405	23.37
C-I	3.934013	-8.243241	17.15699	15.52566	3.255827	29.40
Constante	-4281.712	-4325.122	-4089.847	-3874.866	-3699.047	

Tabla 21: Coeficientes de clasificación para cada grupo experimental y valores de la D2 de Mahalanobis.

Los resultados de esta clasificación se muestran en la Tabla 22 o matriz de confusión.

Esta matriz presenta, para cada uno de los cinco grupos, el número de

casos en los que tomados aleatoriamente los cráneos y aplicándose las funciones discriminantes se ha clasificado con acierto en el grupo experimental al que pertenecían. En la siguiente columna aparece designado con un número cada uno de los grupos reales de pertenencia. A continuación aparecen cinco columnas en las que se indica el grupo predicho. El porcentaje de acierto fue del 100%, lo que indica que el análisis discriminante es totalmente efectivo.

MATRIZ DE CONFUSION					
	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
n° de casos	8	9	10	9	10
% de coincidencia	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabla 22: Matriz de confusión (clasificaciones correctas).

La discusión de los resultados proporcionados por el análisis discriminante vamos a iniciarla precisamente por el porcentaje de acierto obtenido cuando en las cinco ecuaciones matemáticas se sustituye el valor que presenta cada uno de nuestros animales, escogido al azar, para cada una de las trece variables seleccionadas. Al ser el porcentaje de acierto del 100% se confirma la valía de esas variables a la hora de diferenciar unos grupos de otros y, consecuentemente, que el proceso de selección ha sido eficiente.

Por un lado, estos resultados son importantes porque nos apoyan la identidad de los diferentes grupos de tratamiento y, por lo tanto, la del grupo estrés frente al control y al resto de los grupos, algo que para nosotros es particularmente interesante por lo ya comentado en la discusión de los datos del ACP.

De otra parte, su importancia radica en que, a la hora de caracterizar el patrón de crecimiento craneal de nuestros animales, centran nuestra atención en las variables craneométricas seleccionadas. Decimos esto porque ya que la discriminación de los grupos gira en torno a unas características craneométricas, la selección de estas trece variables lo que manifiesta es la existencia de una diferente sensibilidad de las zonas craneales a ser modificadas

en su crecimiento por los tratamientos y, por consiguiente, la existencia de un patrón de crecimiento característico de nuestros animales. Este patrón de crecimiento ha sido ya establecido en el apartado relativo al estudio univariante así como en relación al análisis de componentes principales, y es corroborado por estos resultados.

Nos interesa, por lo tanto, conocer cuáles son esas trece variables seleccionadas por el análisis discriminante y con qué zonas del cráneo se relacionan.

Observamos que una de las variables (C-F o longitud cigobregmática) se relaciona con la región cigomática que, como vimos, se caracterizaba por su elevada sensibilidad a ser afectada en su crecimiento. Además, la selección de esta única variable por el análisis discriminante la señala, de entre las definidas por nosotros sobre dicha región, como la más representativa de la misma.

Otras diez de las variables seleccionadas se pueden agrupar por ser variables que se definen en mayor o menor medida sobre la longitud del cráneo (A-B, K-M, 10-12, 3-12, 3-4, G-1, 5-6, B-E, E-I y C-I), dimensión que comparte con la zona cigomática esa capacidad de respuesta a los efectos reductores de los tratamientos. Observamos además que tres de estas variables (10-12, 3-12 y 3-4) son algunas de aquellas relacionadas, en su momento, con un efecto de reforzamiento de la región occipital observado exclusivamente en los animales tratados con ruido. Por lo tanto, su discriminación por el análisis nos pone de manifiesto la importancia que también presentan, en nuestro estudio, a la hora de diferenciar de forma específica los animales del grupo estrés de los restantes. En este contexto es como debe discutirse la selección de la variable G-1 o longitud del hueso supraoccipital, que recordemos era una de las variables altamente resistentes a ser reducida por los tratamientos. Por consiguiente su discriminación no permitiría diferenciar los grupos en función de esos efectos reductores pero sí caracterizar el grupo estrés atendiendo al efecto de reforzamiento occipital ya comentado.

El análisis discriminante selecciona otras dos variables (1-2 o altura exooccipital y 2-3 o altura del *foramen magnum*) que representan en cierto grado a la dimensión "altura" del cráneo. En el ACP planteábamos la posibilidad de que esta dimensión se comportase de una forma similar a la dimensión "anchura", de tal modo que la estabilidad de su crecimiento explicaría la necesidad de una cierta intensidad de acción glucocorticoide para

detectar efectos por los tratamientos, siendo estos de pequeña magnitud en algunas variables (altura exoccipital) o incluso inexistentes (altura del *foramen magnum*).

El hecho de que el análisis discriminante seleccione estas variables como significativas en la discriminación de los grupos y no suceda así con las variables de anchura, ni siquiera con la que manifiesta cierta capacidad de respuesta, no es contradictorio con lo ya discutido. Constituye únicamente un leve matiz diferencial, por un lado, entre ambos modelos matemáticos y, por otro, entre el crecimiento del cráneo en altura y anchura en este periodo de edad. Ambas dimensiones craneales muestran en estos animales una notable estabilidad de su crecimiento por lo que los tratamientos afectan muy poco o nada a estas variables (análisis univariante). Como consecuencia, las variables representativas de estas dimensiones craneales caracterizan secundariamente los efectos de los tratamientos en comparación con las de longitud del cráneo o con las del arco cigomático (agrupación de las mismas en el factor 2 por el ACP). Por último el análisis discriminante selecciona el menor número de variables que mejor caracterizan los efectos pero no otorga peso a las mismas como hace el ACP. En esa idea opta por elegir como representantes de las dimensiones craneales con crecimiento más estable a las variables de altura en vez de las de anchura.

En relación con estas dos dimensiones, de todos los datos procedentes de ambos análisis, podemos concluir que, a la edad y sexo de nuestros animales, el cráneo muestra muy pequeña capacidad de crecimiento en anchura y altura si se compara con el crecimiento en longitud, lo que indica que el crecimiento en estas dimensiones se halla prácticamente estabilizado. Esta estabilidad podría ser menos acentuada en altura que en anchura de acuerdo con los resultados del análisis discriminante que elige a las variables de altura como discriminatorias de los efectos. En realidad, el ACP ya incidía en esta última idea cuando agrupaba la variable de altura que presentaba cierta capacidad de cambio (altura exoccipital) en el factor 1 y no en el factor 2 donde, sin embargo, se agrupaba la variable de anchura que también mostraba una pequeña capacidad de respuesta con otras variables de anchura y altura que no sufrían modificaciones por efecto de los tratamientos. Además, el ACP al asignarle a esa variable de altura un coeficiente de correlación en el factor 1 muy pequeño estaba indicando, frente a las variables relacionadas con la longitud o con el arco cigomático, el pequeñísimo grado en que es determinante de la diferenciación de los grupos.

Reuniendo toda la información referente a la caracterización del patrón

de crecimiento craneal de nuestros animales que hemos ido obteniendo de los resultados de los dos análisis multivariantes, podemos concluir que se confirman las tendencias deducidas del estudio univariante. Estas tendencias apuntan hacia un patrón caracterizado por un crecimiento del cráneo en longitud y una gran plasticidad de la región cigomática. Por el contrario, el cráneo de estos animales presenta una considerable estabilidad del crecimiento en anchura y en altura, aún cuando la estabilidad del crecimiento en altura podría ser, como hemos visto, menos acentuada que la del crecimiento en anchura. Finalmente, la estabilidad del crecimiento craneal adquiere su máxima expresión en lo relativo a la longitud del hueso supraoccipital.

Hace tiempo que no hacemos referencia a la agrupación de las variables de longitud según pertenezcan al neuro o al esplanocráneo. Ello obedece a que ni el ACP ni el análisis discriminante establecen una diferenciación entre ambas zonas. Sin embargo, creemos que es oportuno no olvidar que los resultados del estudio univariante sí permitían distinguir matices entre la capacidad de alteración del neuro y del esplanocráneo.

Considerando siempre el crecimiento en longitud, el neurocráneo parecía ser más sensible pero presentaba menor capacidad de alteración de su crecimiento, probablemente más estabilizado en este periodo del desarrollo de la rata.

El esplanocráneo se mostraba como la parte del cráneo más plástica, tanto en su capacidad de crecimiento longitudinal, como por contener la región más variable de todo el cráneo, la arcada cigomática.

Por lo que respecta a los otros dos objetivos secundarios, observamos que ya que este análisis es esencialmente una técnica de clasificación, podríamos realizar predicciones sobre el grupo de pertenencia, en cuanto a los efectos reductores sobre el crecimiento craneal, de animales de iguales características (estirpe, sexo y edad) que los utilizados en esta Tesis y expuestos a cualquier tratamiento del que se sospeche dichos efectos. Para ello deberemos tener en cuenta, una vez más, el efecto de tales tratamientos sobre esas trece variables craneométricas que, según este análisis, mejor contribuyen a explicar las diferencias entre los grupos experimentales.

Así, después de sustituir en las cinco ecuaciones matemáticas obtenidas

los valores que para esas trece variables presenta cada individuo de uno de esos tratamientos de los que se sospecha un efecto reductor sobre el crecimiento, y asignarlo a uno de nuestros cinco modelos experimentales, podremos confirmar que efectivamente posee un efecto reductor y que su intensidad es comparable a la que muestra el efecto causado por el grupo de tratamiento en el que se clasifica. Además, si se tiene la certeza de que hay un efecto reductor y de que éste es mediado por la actividad glucocorticoide, podremos conocer aplicando estas ecuaciones a qué grupo de tratamiento es comparable no sólo en cuanto a la intensidad del efecto reductor, sino también a la intensidad de la actividad glucocorticoide que lo media.

La respuesta al otro de los objetivos secundarios está presente en todos los resultados mencionados desde el mismo momento en que el análisis selecciona trece de las veintiuna variables de partida, reduciendo de ese modo el número de variables a considerar. Obviamente ello supone una facilitación del trabajo sin que se pierda información de interés.

En resumen, de la discusión de los resultados tanto de la aplicación del análisis de componentes principales como del análisis discriminante a nuestras variables craneométricas, vemos que tenemos en la estadística multivariante un "arma" eficaz para caracterizar el patrón de crecimiento craneal de nuestros animales. Además nos ha brindado otras posibilidades interesantes al facilitarnos el diseño experimental de futuros trabajos así como la posibilidad de establecer comparaciones entre nuestros tratamientos y los empleados por otros grupos de investigación, siempre y cuando se cumplan los requisitos mencionados al efecto. Todo ello facilitado a su vez al permitirnos manejar abundante información de una forma más sencilla.

Hasta este punto, estos resultados y su correspondiente discusión han dado respuesta a los Objetivos 3a, 3b y 3c, recogidos en el capítulo referente al esqueleto. Estos tres objetivos giran en torno a un eje común que es el crecimiento animal. Resulta interesante para nosotros conocer ahora si una actividad glucocorticoide intensificada, capaz de mediar alteraciones en el crecimiento que alcanzan a manifestarse en el esqueleto, es capaz también de afectar el contenido mineral de éste. De esa manera abordaremos el Objetivo 3d con el que, a través de una perspectiva diferente, completaremos nuestro estudio sobre el esqueleto craneal.

5. ALTERACIONES EN EL CONTENIDO DE MACRO Y MICRO CONSTITUYENTES DEL HUESO

5.1. CONSTITUYENTES MINERALES

Las muestras óseas utilizadas para evaluar el contenido mineral fueron las mandíbulas de los animales. Estas piezas del esqueleto craneal no se incluyeron en el estudio craneométrico. Se cuantificaron ocho constituyentes minerales a través de la técnica de ICP-AES. Los valores de estos elementos aparecen en la Tabla 23, expresados como medias aritméticas (m) y desviaciones estándar (ds), mientras que el resultado de su evaluación estadística se muestra en la Tabla 24.

CONSTITUYENTES MINERALES DEL HUESO (ppm/100 g de peso calcinado)					
	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
Ca	340800 ± 4878	356160 ± 5391	349214 ± 11459	357426 ± 6353	372076 ± 23265
P	176820 ± 5066	182960 ± 9594	178386 ± 8941	176764 ± 1556	176924 ± 6327
Mg	8970 ± 631	7165 ± 1109	7448 ± 719	7629 ± 264	6784 ± 438
Zn	378 ± 102	751 ± 229	417 ± 57	338 ± 20	415 ± 133
Fe	120.40 ± 16.39	102.98 ± 9.49	133.33 ± 45.57	87.41 ± 30.77	103.47 ± 25.38
Sr	73.24 ± 4.95	96.30 ± 5.43	100.86 ± 6.36	105.01 ± 3.23	78.51 ± 5.02
Ba	7.48 ± 1.38	11.58 ± 0.75	14.61 ± 2.25	14.99 ± 1.22	13.75 ± 1.92

Tabla 23: Constituyentes minerales del hueso.

Los datos indican la media ± desviación estándar.

Como puede observarse, en la Tabla 23 tan sólo aparecen los resultados referidos a siete de los minerales evaluados, correspondiendo al cobre el dato que falta. Los resultados obtenidos para el cobre demostraron, en todos los animales, que su presencia en el hueso se limita a cantidades muy minoritarias frente al resto de los elementos. En ocasiones, los valores se hallan por debajo del rango de detección de la técnica empleada, a pesar de ser

ésta de alta sensibilidad, por lo que no se obtuvo ningún valor numérico. En estas condiciones no pudo establecerse una comparación estadística entre grupos considerando a este elemento por lo que se procedió a su exclusión.

ANOVA Y COMPARACIONES EMPAREJADAS (Test de Scheffe)							
Elementos	Anova F(4,22)	Significación	Co	Str	Ac	Dx	DxStr
Ca	4.52	$p \leq 0.01$	e	ns	ns	ns	a
P	0.69	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mg	7.13	$p \leq 0.001$	bce	a	a	ns	a
Zn	8.89	$p \leq 0.001$	b	acde	b	b	b
Fe	1.99	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sr	38.00	$p \leq 0.001$	bcd	ae	ae	ae	bcd
Ba	18.05	$p \leq 0.001$	bcde	a	a	a	a

Tabla 24: Evaluación estadística de los resultados de los constituyentes minerales.

Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo de la columna considerada y los diferentes grupos experimentales, teniendo en cuenta que a= Co, b= Str, c= Ac, d= Dx y e= DxStr.

El tratamiento con estrés sonoro alteró el contenido de los constituyentes minerales de las mandíbulas, incrementando los niveles de bario, estroncio y cinc, y disminuyendo los de magnesio ($p \leq 0.05$ vs Co).

La administración de ACTH también aumentó de forma significativa respecto al control el contenido de bario y estroncio, y disminuyó los niveles de magnesio ($p \leq 0.05$), pero no modificó el contenido de cinc. No aparecen diferencias significativas frente al tratamiento con ruido para dichos elementos.

La administración de dexametasona incrementó los niveles de bario y estroncio ($p \leq 0.05$ vs Co), pero no reprodujo la reducción del contenido de magnesio. No se aprecian diferencias estadísticas para estos constituyentes entre este tratamiento y los de estrés y administración de ACTH.

El tratamiento conjunto de exposición a estrés sonoro y de administración de dexametasona provocó también un aumento del contenido de bario ($p \leq 0.05$ vs Co), aunque no el de estroncio, y una reducción significativa del contenido de magnesio ($p \leq 0.05$ vs Co). Sin embargo, en esta ocasión se produjo además un aumento significativo del contenido de calcio ($p \leq 0.05$ vs Co). No hubo diferencias significativas entre estos resultados y los del tratamiento único de dexametasona, a excepción de los niveles de estroncio ($p \leq 0.05$ vs Dx) los cuales eran elevados en dicho tratamiento pero no se alteran en el tratamiento conjunto.

De un juicio general de nuestros resultados, se desprende, en un primer momento, dos hechos: la nula participación del cobre en la composición ósea de estos animales y que el calcio es, como era previsible, el elemento mayoritario.

Por otra parte, observamos que el contenido de fósforo y de hierro no manifiesta una alteración significativa por ningún tratamiento. Este hecho puede interpretarse como una carencia de acción reguladora, sobre el hueso, de la homeostasis de estos elementos mediada por los glucocorticoides. Sin embargo no se puede asegurar esta posibilidad, ya que desconocemos si el contenido óseo de estos elementos puede ser alterado por una actividad glucocorticoide de mayor intensidad que la utilizada por nosotros. En cualquier caso, estos resultados nos conducen a excluir posibles acciones específicas por parte de cualquiera de nuestros tratamientos y, por consiguiente, a estos oligoelementos como posibles marcadores de la activación glucocorticoide propia y mediadora de un estrés ambiental inespecífico y moderado.

Sí encontramos, por el contrario, una alteración del contenido óseo de calcio, bario, estroncio, magnesio y cinc debida a nuestros tratamientos experimentales. Sin embargo, estas alteraciones no presentan un patrón común para todos los elementos evaluados

ya que las alteraciones encontradas suponen incrementos o decrementos según el elemento considerado, y también, porque no siempre los tratamientos reproducen los mismos efectos de acuerdo con su correspondiente intensidad de actividad glucocorticoide. Por el contrario, hay efectos que parecen estar mediados por mecanismos activados en algunos de los tratamientos pero inhibidos en otros, y la dexametasona no actúa en todos los casos como análogo estricto de la corticosterona.

Como consecuencia de ello, deberemos establecer la discusión de estos resultados considerando a los elementos independientemente o agrupándolos desde diferentes perspectivas.

Observamos, en efecto, que el contenido en el hueso de bario, estroncio, magnesio y cinc se modifica en los animales estresados. Ante estos resultados, la pregunta que a continuación se nos plantea es si la modificación del contenido de estos elementos es un reflejo de la estimulación de la actividad corticoadrenal y, por lo tanto, un efecto del aumento de los niveles circulantes de glucocorticoides que acompaña a las situaciones de estrés. Para responder a esta pregunta, vamos a ir comparando los resultados referidos a los animales expuestos al ruido con los datos relativos a los tratados con ACTH y dexametasona. De este modo, si la modificación del contenido de estos elementos en los animales estresados está mediada por los glucocorticoides, deberíamos encontrar que dicho contenido también se modifica en los otros tratamientos de comparación.

En relación al cinc, vemos que el hecho de que su contenido sólo sea modificado en el hueso de los animales estresados, nos permite concluir que tal efecto no es mediado por el aumento de glucocorticoides circulantes que desencadena la exposición al estrés. Posteriormente comentaremos otros aspectos relativos al posible significado de este resultado. Sin embargo, resulta interesante discutir ahora el hecho de que los animales tratados con dexametasona y además expuestos al estímulo sonoro, no presenten ninguna modificación del contenido óseo de este elemento. Dado que los animales son estresados deberían mostrar un aumento del contenido de cinc, si bien se podría pensar que la dexametasona estuviera ejerciendo un efecto inhibitor sobre esa acción específica del estímulo.

Respecto al bario y al estroncio, el aumento de su contenido óseo en los animales estresados también se observa en los individuos a los que se les administró hormonas,

de modo que podemos atribuir esta modificación a la acción glucocorticoide. Además, los valores numéricos parecen indicarnos que existe una correlación entre la intensidad de la actividad glucocorticoide asociada a cada uno de esos tratamientos, y la intensidad del efecto producido sobre el contenido de estos dos elementos en el hueso. Sin embargo, esta posible correlación no puede ser aseverada ya que no hallamos diferencias significativas entre esos valores, quizás porque ya el exceso de corticosterona provocada por el estrés sea suficiente para alcanzar el "techo" en el depósito óseo de estos elementos. Hay que tener en cuenta que la propia palabra "oligoelemento" nos indica que su presencia en hueso es minoritaria. En consecuencia, al movernos en órdenes de magnitud mínimos, resulta fácil que una pequeña variación del estímulo provoque una saturación de estos niveles.

Respecto al magnesio, observamos que su contenido se reduce significativamente en el hueso de los animales estresados y en los tratados con ACTH pero no en los administrados con dexametasona. Es obvio, por lo tanto, que esta reducción del contenido de magnesio en el hueso debe ser mediada por un factor común tanto al tratamiento estresante como al tratamiento con ACTH. Ambos tratamientos tienen en común niveles elevados de corticosterona pero, también, los elevados niveles circulantes de ACTH que resultan, en un caso, de la activación del eje HHA producida en respuesta al estímulo estresante y, en el otro, de la propia dosis de ACTH administrada a los animales así tratados. De ser este factor el que modifica el contenido de magnesio, habría que considerar no sólo una acción directa de la ACTH, sino también el que dicha acción pudiera ser ejercida a través de un elemento mediador.

Sin embargo, no disponemos de ningún dato propio o bibliográfico que nos permita apoyar esta hipótesis en contra de otras opciones. La ausencia de un efecto significativo por la administración de dexametasona nos permite descartar una acción de este glucocorticoide sintético sobre dicho contenido, pero no excluye una acción propia de los elevados niveles circulantes del glucocorticoide endógeno: corticosterona, presentes tanto en los animales estresados como en los tratados con ACTH.

De hecho, aun cuando en nuestro estudio se emplea la dexametasona como un análogo sintético de la corticosterona, a fin de evaluar los efectos de la acción glucocorticoide creciente de nuestros tratamientos, ambos glucocorticoides no tienen porqué ejercer una acción estrictamente análoga. Por lo tanto podríamos encontrar un efecto

glucocorticoide sobre el magnesio mediado por la corticosterona (tratamientos con ruido y ACTH) y no por la dexametasona.

Un resultado similar ya fue encontrado al demostrar que la dexametasona, aunque sí reproduce los efectos de la corticosterona produciendo aplasia del encéfalo y de otros órganos, no se comporta de forma similar respecto a las alteraciones del tamaño celular del encéfalo. En aquel caso, para explicar estas diferencias, dispusimos de información bibliográfica en relación con la presencia en el encéfalo de distintos tipos de receptores de glucocorticoides.

De lo discutido podemos entonces resumir que el efecto reductor observado sobre el contenido óseo de magnesio puede obedecer bien a una acción de la corticosterona, bien a una acción de la ACTH, lo cual explicaría que encontremos dicho efecto en los animales estresados y en los tratados con ACTH. Este efecto, además, no es reproducido por la dexametasona, como pone de manifiesto la ausencia del mismo en los animales administrados con este glucocorticoide sintético.

Llegado este punto, es el momento de acudir a los resultados referidos al contenido óseo de magnesio en los animales tratados con dexametasona y ruido, los cuales están constatando una reducción significativa de dicho contenido. Si nuestra hipótesis acerca de la identidad de los posibles mediadores del efecto reductor de este elemento en el hueso fuese cierta, no deberíamos encontrar una alteración significativa de este parámetro por el tratamiento conjunto. La razón es lógica, ya que si bien los animales de este tratamiento son estresados y en consecuencia sus niveles de ACTH y corticosterona aumentan respecto al tratamiento único con dexametasona, sin embargo esa estimulación del eje HHA se produce estando éste funcionalmente muy deprimido como consecuencia de la administración previa de la dexametasona, la cual no ejerce acción sobre el magnesio. Ello hace que los niveles de ACTH y corticosterona en los animales del tratamiento conjunto estén en realidad muy por debajo de los basales y, por lo tanto, no mediarían por sí solos ningún efecto significativo sobre el contenido óseo de magnesio. Efectivamente así sería a no ser que, al igual que hemos observado con el cinc, se estuviese ejerciendo un posible efecto propio de nuestro modelo de estrés y ajeno a la activación del eje HHA.

Esta posibilidad estaría de acuerdo con los resultados hallados en los

animales estresados y en los tratados con ACTH, ya que si la reducción del contenido de este elemento fuese el resultado sólo de la activación hipófiso-adrenal, deberíamos haber encontrado un mayor efecto por el tratamiento con ACTH que por el estrés, dada la superior activación hipófiso-adrenal que ocasiona el tratamiento hormonal (mayores niveles de corticosterona y ACTH). Por el contrario no observamos una correlación positiva, lo cual refuerza la hipótesis planteada y así, en los animales estresados, la actuación de ese posible efecto propio del ruido, previo a la activación del eje HHA, junto con el debido a dicha activación conseguiría que no se apreciaran diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento, tal y como muestran los resultados.

Desde esta perspectiva podríamos pensar que la explicación de los efectos encontrados en cada uno de nuestros grupos experimentales fuera la siguiente:

En los animales estresados la reducción del contenido de magnesio sería un efecto debido por un lado a la moderada activación hipófiso-adrenal (corticosterona o ACTH) y por otro a una acción propia del ruido, mediada o por otro eje endocrino o por otros factores desencadenados a nivel del SNC, punto de integración del estímulo.

En los animales tratados con ACTH los mediadores de dicha reducción serían únicamente la activación hipófiso-adrenal vinculada a la ACTH o a la corticosterona ya que no hay activación del SNC. Dicha activación hipófiso-adrenal, al ser mayor en el caso de la ACTH que en el ruido, suple el efecto sumativo de ambos factores en los animales estresados igualando los resultados.

Por su parte, la administración de dexametasona no presenta activación del SNC, inhibe el eje HHA y como glucocorticoide no reproduce el efecto de la corticosterona sobre el magnesio por lo cual no modificaría el contenido de este elemento. Mientras que si a los animales además de administrárseles dexametasona se les expone al ruido sería el efecto propio de este estímulo el responsable único de la reducción significativa de magnesio que presentan.

A este respecto cabe mencionar que el aumento del contenido de cinc en el hueso sería también el resultado de un efecto propio del ruido pero a diferencia del magnesio es un efecto al que no se suma el de la activación del eje HHA, motivo que explica que dicho

aumento sólo se observe en los animales estresados.

En resumen, sólo el contenido óseo de uno de los cuatro elementos citados, el cinc, no parece verse afectado por la acción de los glucocorticoides pero sí por algún factor desencadenado por la estimulación nerviosa del ruido. Para el bario, el estroncio y el magnesio podemos hablar de un efecto por la activación hipófiso-adrenal y para el cual, en el caso del magnesio, la dexametasona no se comporta como un análogo sintético de la corticosterona. Además, sobre el contenido de magnesio constatamos también la acción de un efecto propio de nuestro modelo estresante descrito ya para el cinc.

Quizás sea éste el momento adecuado para aclarar conceptos acerca de cuándo nos referimos a un efecto específico del ruido, considerando a éste como un modelo de estrés ambiental, y cuándo el efecto puede ser interpretado como un marcador de estrés inespecífico.

Es necesario hacer una aclaración de estos términos porque puede ocurrir que no sean utilizados con el mismo sentido desde la perspectiva de antropólogos físicos y fisiólogos. Conviene recordar que el término estrés, y su definición, surge en el campo de la Fisiología y es acuñado por Cannon y Selye partiendo del concepto de homeostasia de Claude Bernard. El término estrés se refiere a cualquier cambio ambiental o del medio interno que desencadena una respuesta fisiológica neuroendocrina concreta, específica y bien conocida, cuyo resultado final y sus efectos crónicos son mediados por glucocorticoides (ver Introducción).

Por consiguiente, cualquier alteración que guarde relación dosis-efecto con los niveles circulantes de glucocorticoides (fundamentalmente endógenos) podrá ser considerado marcador de estrés inespecífico pues será reproducido por cualquier agente capaz de estimular la producción endógena de estas hormonas.

Sin embargo, efectos como el demostrado para el cinc, que se encuentra en un modelo de estrés concreto (ruido) pero que no parece ser mediado por la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, pueden ser considerados marcadores específicos de ese agente estresante.

De la relación de elementos minerales cuyo contenido es alterado por

los tratamientos, el único que no ha sido aún considerado es el calcio. El contenido óseo de este mineral sólo resulta alterado significativamente en el tratamiento conjunto con dexametasona y estrés.

De estos resultados se desprende que dicha alteración no puede atribuirse a un efecto propio o exclusivo del ruido, ni al nivel de activación del eje HHA encontrado en los animales estresados o administrados con ACTH. Tampoco la acción glucocorticoide de la dexametasona, por sí sola, produce efecto pero éste sí se manifiesta cuando a la dexametasona se adiciona algún factor contenido en el estrés.

Una explicación a este último dato podría encontrarse en que el umbral de acción glucocorticoide necesario para modificar el contenido de calcio en el hueso sea muy alto y no se consiga un efecto significativo hasta que al nivel de dicha acción mediada por la dosis de dexametasona se le añada la pequeña pero significativa hipersecreción de corticosterona (Tabla 3). De hecho, los niveles de calcio son mayores también en los animales de los restantes tratamientos que en los controles, aunque estadísticamente no significativos.

Esto nos lleva a plantearnos los conceptos de distinta sensibilidad y tolerancia de los elementos minerales frente a la intensidad de la acción glucocorticoide, como hicimos con otros parámetros. Así observamos que el hueso presenta una modificación de su contenido en bario, estroncio y magnesio ya a la intensidad del tratamiento estresante, mientras que sólo cuando se alcanza la debida al tratamiento conjunto de exposición al ruido y administración de dexametasona, encontramos una alteración significativa del contenido de calcio.

Nosotros pensamos que este hecho podría atribuirse a que el calcio, a diferencia de los otros iones mencionados, es un elemento sobre el que recaen numerosos sistemas reguladores que posibilitan un control muy estrecho de sus niveles circulantes, lo que dificultaría encontrar una alteración significativa de sus concentraciones en hueso a bajas intensidades de acción glucocorticoide. Podríamos considerar que hay una protección fisiológica frente a la homeostasis del calcio.

Respecto al margen de saturación de respuesta, si bien el bario y el estroncio son como vemos constituyentes del hueso muy sensibles, también son los que

presentan un margen de saturación menor pues es a la intensidad del tratamiento estresante cuando estas dos variables muestran su máxima alteración.

Diferente es el caso del magnesio, sobre cuyo contenido en el hueso la dexametasona no ejerce acción, en consecuencia debería estudiarse la respuesta frente a una mayor intensidad del estrés o una mayor dosis de ACTH. Respecto al calcio, nada puede decirse acerca de si su margen de saturación es grande o no, ya que para ello necesitaríamos exponer a nuestros animales a tratamientos de superior intensidad glucocorticoide que la representada por el tratamiento conjunto de dexametasona y ruido. Recordemos que era a la intensidad de la acción glucocorticoide asociada al tratamiento conjunto a la cual los animales mostraban una modificación significativa del contenido de calcio en el hueso.

Observamos, por lo tanto, un diferente comportamiento de los elementos minerales evaluados frente al grado de actividad hipófiso-adrenal de los tratamientos. El cinc no es sensible a esta activación mientras que el estroncio, bario y magnesio demuestran gran sensibilidad a la misma. El calcio sí es susceptible pero a partir de una intensidad de actividad glucocorticoide mayor (grupo DxSt). Respecto al grado de activación en el que se saturan los efectos, es muy bajo para el estroncio y el bario (que han alcanzado su efecto máximo ya en los animales estresados) y, por las circunstancias comentadas, no puede establecerse para el magnesio y el calcio precisándose niveles de activación adrenal o intensidad del estímulo superiores a los utilizados por nosotros.

Hasta ahora hemos discutido nuestros resultados desde el punto de vista de los mecanismos que los provocan y que están presentes en los diferentes tratamientos, desde la activación hipófiso-adrenal y la actividad glucocorticoide hasta los efectos que podrían ser considerados específicos del estímulo (ruido). Pero, como hemos podido observar, no todos los constituyentes muestran variaciones de su contenido en el hueso en el mismo sentido. Independientemente de su mayor o menor sensibilidad a los tratamientos, nuestros resultados indican que mientras el contenido en el hueso de calcio, bario y estroncio aumenta, el de magnesio disminuye. Por lo tanto, ahora intentaremos justificar y dar sentido a esos cambios desde una perspectiva fisiológica.

En conjunto podríamos sugerir que se está produciendo por el efecto de los tratamientos un proceso de mineralización ósea, ya que los cambios observados en el

contenido mineral del hueso son mayoritariamente de aumento a excepción del magnesio. Esta mayor mineralización es acorde con el estudio de **Leblondel y Allain (1988a)** al mostrar también un aumento del contenido de minerales específicos tras la administración de glucocorticoides.

Vamos, en primer lugar, a tratar de discutir a qué obedece el aumento generalizado del contenido mineral del hueso mostrado por nuestros resultados. De los tres constituyentes minerales (calcio, estroncio y bario) cuyo contenido en el hueso aumenta, es evidentemente el calcio el que más contribuye a esa superior mineralización, por ser el elemento mayoritario en el hueso. Este hecho, y un conocimiento más amplio de los mecanismos que regulan su homeostasis, son los motivos por los que vamos a discutir con mayor profundidad los resultados a él referidos.

El mantenimiento constante de los niveles de calcio circulante en sangre depende de un equilibrio muy fino, lo que implica una dependencia entre las acciones reguladoras que se ejercen en tres puntos: absorción a nivel intestinal, excreción a nivel renal y reserva a nivel del esqueleto, requiriéndose por lo tanto una estricta coordinación que las ligue.

Varios autores han constatado que la administración de glucocorticoides ocasiona una disminución de la absorción intestinal de calcio (**Klein y cols., 1977; Hanh y cols., 1981**) y un aumento de su excreción urinaria (**Suzuki y cols., 1983; Prummel y cols., 1991**). Se interpreta que es a través de estas acciones sobre la absorción intestinal y la excreción urinaria del calcio, como los glucocorticoides provocan una reducción de la calcemia (**Reid, 1989**). Nuestros resultados aportan a este respecto otro dato y es el aumento del contenido de calcio en el hueso por acción de estas hormonas. En este sentido, nuestros resultados están apoyados por los de **Leblondel y Allain (1988a)** los cuales constatan también un aumento del contenido de calcio en el hueso por la administración de glucocorticoides.

Este aumento de los niveles de calcio que nosotros encontramos en el hueso podría estar mostrándonos quizás un efecto propio de estas hormonas sobre la homeostasis del calcio, que no ha sido señalado hasta ahora, de forma que la reducción de la calcemia observada tras la administración de glucocorticoides no sólo obedecería, como hemos mencionado, a una disminución de la absorción intestinal de calcio y a un incremento de su

excreción urinaria, sino también a un posible efecto sobre el hueso provocando una calcificación del mismo.

Sin embargo, ha sido clásicamente aceptado que la reducción de la calcemia provocada por los efectos de los glucocorticoides sobre la absorción intestinal y excreción renal debía estar compensándose por la salida de calcio desde el hueso, con la consiguiente desmineralización y/o reabsorción del mismo (**Reid, 1989**). Obviamente dicha salida compensatoria no era del todo eficaz ya que la hipocalcemia se detectaba. Nuestros resultados demuestran que, contrariamente a lo que se creía, esta acción descalcificadora es mediada por los glucocorticoides aunque puede estar siendo desencadenada por otros factores.

Recordemos a este respecto las acciones de la hormona paratiroidea (PTH) y de los metabolitos de la vitamina D. De una forma resumida, veíamos que la secreción de la hormona paratiroidea se incrementaba en respuesta a una caída de la calcemia, estimulando entonces la actividad osteoclástica y, por consiguiente, la reabsorción de hueso y la movilización de su contenido de calcio. Además, la hormona paratiroidea trata de corregir los efectos hipocalcémicos de cualquier factor (por ejemplo, los glucocorticoides) también a nivel intestinal y renal por sus demostrados efectos (ver Introducción) a estos niveles, tanto directos como mediados por el calcitriol (metabolito más activo biológicamente de la vitamina D).

Por consiguiente, los resultados relativos al contenido óseo de calcio observados en nuestros animales, nos conducen a pensar que la acción de los glucocorticoides aumentando el contenido de este elemento en el hueso y la acción de reabsorción ósea desencadenada por otros factores endocrinos (entre ellos, la PTH y los derivados de la vitamina D) están estableciendo entre sí una relación de competencia.

Efectivamente, si el exceso de glucocorticoides circulantes es moderado, el aumento óseo de calcio mediado por los mismos es pequeño y puede ser contrarrestado por los restantes factores hormonales descritos, los cuales se han disparado frente a la hipocalcemia. En ese caso, el contenido de calcio en el hueso puede no ser alterado, ni en un sentido ni en otro, aunque la hipocalcemia debida a los efectos sobre el intestino y riñón se produzca. Ello explicaría la ausencia de alteraciones en los tratamientos con ruidio, ACTH e incluso dexametasona.

Sin embargo, puede existir un límite superado el cual el exceso de glucocorticoides sí provoque un aumento significativo de calcio en el hueso haciendo ineficaz la regulación por la PTH y la vitamina D. En nuestro caso, dicho límite lo representaría el tratamiento conjunto con dexametasona y ruido. Esta hipótesis tiene un sentido adaptativo claro para el animal por el cual, frente al exceso moderado de glucocorticoides en situaciones cotidianas de estrés inespecífico, habría una protección ósea.

En consecuencia, el calcio se encuentra bajo un control homeostático tan fino, que sólo va a poder actuar como marcador de estrés ambiental inespecífico en situaciones en las que él mismo adquiere unos niveles que superan lo predecible. Excepción a esto sería el caso en que el estrés consistiese en alguna de las diversas patologías que tienen reconocidos efectos descalcificadores. Pero en este caso no se puede hablar de estrés ambiental inespecífico y los mediadores de las acciones serían ajenos a los glucocorticoides.

Por otra parte, nuestros animales presentan además una pérdida de masa ósea tal y como se deduce de los resultados de peso de sus cráneos. Parte de estos datos, concretamente los referidos a los animales estresados, aparecieron en la Tabla 18, pero entonces el motivo por el que se pesaron los cráneos obedecía a otra finalidad diferente y concernía exclusivamente a dicho grupo de tratamiento. Sin embargo, ya que obtuvimos resultados significativos para el grupo de animales estresados procedimos en dicho momento a evaluar también ese parámetro en los restantes grupos experimentales aun cuando no se mostrasen en dicha tabla. Es ahora cuando, desde otra perspectiva, reflejamos esos resultados para todos los grupos de animales.

Como podemos observar, nuestros animales presentan una disminución del peso del cráneo tras la exposición de los mismos a los diferentes tratamientos. Este efecto guarda además correlación con la intensidad de la actividad glucocorticoide de cada tratamiento. En relación a este resultado podríamos objetar que tal disminución fuese en realidad consecuencia de un menor tamaño de los huesos craneales. Esto podría ser cierto para los animales de los tratamientos en los que se manifiesta claramente una reducción generalizada del tamaño del cráneo. Sin embargo, la única interpretación del menor peso craneal de los animales expuestos al ruido es la reducción de la masa del hueso, ya que la moderada intensidad del tratamiento con ruido causa, como vimos en su momento, una reducción poco significativa del

crecimiento del cráneo. En los restantes tratamientos de superior intensidad glucocorticoide, la reducción del peso del cráneo responde obviamente a una reducción de su crecimiento, pero también a una reducción de la masa de hueso. Decimos esto último porque si así sucede ya a la moderada intensidad del estrés, es lógico pensar en ese mismo efecto a una actividad glucocorticoide más intensa.

PESO DEL CRANEO (g)		
Grupo	m ± d.s.	Significación
Co	2.45 ± 0.15	bcd
Str	2.26 ± 0.13	ade
Ac	2.17 ± 0.16	ade
Dx	2.00 ± 0.07	abc
DxStr	1.91 ± 0.10	abc
Grupo experimental F (4,37) = 23.38 p ≤ 0.001		

Tabla 25: Peso del cráneo.

Los datos indican la media ± desviación estándar.
Los superíndices representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales: a= Co, b= Str, c= Ac, d= Dx y e= DxStr.

En este sentido, estudios de otros autores relacionan los niveles suprabasales de glucocorticoides, tanto en situaciones fisiológicas como farmacológicas, con un balance negativo de calcemia y con la incidencia de pérdida de masa ósea (Lukert y Raisz, 1990; Niewoehner, 1993; Olbricht y Benker, 1993; Seeman, 1993). Sin embargo, esta pérdida de masa del hueso no se debe, a la vista de nuestros resultados, a una mayor desmineralización del mismo. Este hecho nos conduce a pensar que obedezca a una acción inhibidora de los glucocorticoides sobre la formación de hueso, tal y como exponen Hughes-Fulford y cols. (1992). Es decir, una acción reductora de los glucocorticoides del componente celular del tejido óseo, responsable de dicha formación (Dempster, 1989), y no sobre la matriz mineral.

Evidentemente estamos moviéndonos en el terreno de la especulación. Sin embargo, lo importante de esta suposición estriba para nosotros en que constituye una advertencia acerca de que una interpretación más cercana a la realidad de lo que está sucediendo en el hueso pasa por considerar, cuando se dispone de este tipo de resultados, no sólo acciones sobre el componente mineral sino también sobre el componente celular del tejido óseo.

Por consiguiente nuestros resultados, al hacer partícipe al componente celular del hueso en las posibles alteraciones de la cantidad de masa ósea, están cuestionando el uso, ampliamente extendido, que se hace de los conceptos "masa ósea" y "mineralización". Habitualmente se interpreta una disminución de la cantidad de masa ósea como resultado únicamente de una reducción de la mineralización del hueso. Se descarta así que una pérdida de hueso pueda obedecer a una reducción del componente orgánico (celular), al mismo tiempo que el componente residual esté mineralizándose en exceso. Obviamente tal situación conlleva una patología clara ya que la pérdida de masa ósea coincidiría con una menor elasticidad y una mayor dureza del hueso que lo harían más quebradizo o frágil.

Desde este punto de vista se entiende que nuestros resultados y los de **Leblondel y Allain (1988a)** entren en contradicción con los de ciertos estudios (**Gordon y cols., 1992; Kotaniemi y cols., 1993; Laan y cols., 1993**). En esos trabajos también se relaciona el aumento de los niveles circulantes de glucocorticoides con una reducción de la cantidad de masa ósea, pero dicha alteración es finalmente interpretada por los autores como una reducción del componente mineral del hueso o desmineralización. Esos resultados se obtienen a partir del estudio de parámetros tales como la densidad ósea o el peso de las cenizas, pero nunca a partir de la cuantificación de elementos minerales concretos cuyo contenido en el hueso pudiera resultar afectado.

Vemos así que los autores aplican sin más ese concepto por el cual una reducción de la cantidad de masa ósea conlleva de forma inequívoca una disminución del contenido mineral. Nuestros propios datos han constatado que no siempre este supuesto es cierto, hasta el punto de que lo observado es, por el contrario, un aumento de la mineralización asociada a pérdida de masa ósea. A esta divergencia de resultados contribuye también el que los autores, en base a esa asociación entre pérdida de masa ósea y desmineralización, hayan considerado que los mismos parámetros son válidos para medir ambas pérdidas.

Por el contrario, nuestros resultados han puesto de manifiesto que el empleo de parámetros indirectos puede no reflejar con exactitud lo que está sucediendo en tales situaciones con el componente mineral del hueso. De esto último se deriva, pues, otra advertencia importante y es el hecho de que siempre que se desee conocer si se ha producido una modificación del componente mineral, habremos de tener en cuenta además de los niveles de calcemia y parámetros relacionados con la masa ósea, el contenido real de constituyentes minerales específicos, esencialmente del calcio, tal y como nosotros y otros autores realizamos, sin olvidar el control de su incorporación y excreción del organismo.

Es en este sentido, al medir las concentraciones en el hueso de ciertos constituyentes minerales en situaciones de elevados niveles circulantes de glucocorticoides, en el que nuestro estudio resulta novedoso. A este respecto queremos comentar la dificultad que hemos tenido para encontrar, durante la revisión bibliográfica, trabajos que persiguieran hallar explícitamente una relación entre elevados niveles circulantes de glucocorticoides y el contenido en el hueso de elementos minerales concretos. Más todavía aplicados a roedores o en animales de experimentación.

La generalidad de los estudios con animales en los que sí se mide el contenido en el hueso de constituyentes minerales específicos se desarrollan mayoritariamente en un contexto nutricional, referido al consumo de dietas suplementadas con diferentes elementos minerales y su efecto sobre diversas variables, entre ellas el estado del hueso (**Price y cols., 1986; Orwoll, 1992; Kirn y Firman, 1993; Lawson y cols., 1993**). En estos trabajos, aun cuando se cuantifican elementos minerales concretos, no se establece una relación de su contenido en hueso con variaciones en los niveles de glucocorticoides u otros parámetros hormonales, ya que además en ellos las condiciones nutricionales a las que se exponen los individuos se desmarcan de un posible estrés nutricional.

Obviamente con estos precedentes la interpretación de nuestros resultados resulta difícil por carecer de una base firme sobre la que apoyarnos a la hora de su comparación. Sin embargo, esa misma carencia nos permite una visión muy amplia para sugerir sin prejuicios, aunque con la debida precaución, hipótesis que puedan dar respuesta a nuestros resultados.

Así, consecuentemente con todo lo dicho hasta el momento, podemos decir que el aumento del contenido óseo de calcio que observamos no obedecería a una estimulación por los glucocorticoides de la formación de nuevo hueso y su posterior mineralización, sino que sería el resultado de una captación anormalmente excesiva de calcio por un tejido ya formado, o incluso en fase degenerativa por inhibición de su formación, como demuestra el menor peso de los cráneos.

En consecuencia, la hipocalcemia subyacente al exceso de glucocorticoides circulantes es reflejo no sólo de sus acciones reduciendo la absorción intestinal y aumentando la excreción urinaria de calcio, sino también de una captación de este mineral por el hueso. Los mecanismos que tratarían de corregir la calcemia movilizándolo el calcio del hueso entrarían en competencia con esta última acción de los glucocorticoides, dependiendo el nivel de calcificación ósea del equilibrio en este proceso.

En tal caso cabe preguntarse, en este momento, si el ión magnesio desempeñaría alguna función en relación a este mayor contenido de calcio en el hueso. Esta pregunta se nos plantea en vista de que, por el contrario, el contenido de magnesio es el único que disminuye y de que es sabido la estrecha asociación entre ambos iones en numerosos procesos fisiológicos, desempeñando acciones antagónicas. Este antagonismo nos permite pensar en la posibilidad de que los iones calcio se incorporen al hueso al intercambiarse por iones magnesio de la matriz ósea ya formada. La discusión tratamiento a tratamiento de nuestros resultados no apoya rotundamente esta posibilidad.

Resumidamente y dejando en un segundo término todas las suposiciones que han sido planteadas y para las cuales no tenemos una respuesta concluyente, lo que los resultados manifiestan sin lugar a duda es un aumento generalizado del contenido mineral del hueso por nuestros tratamientos experimentales.

Nuestros resultados responden así al Objetivo 3d, de tal modo que podemos concluir que las alteraciones sobre el esqueleto debidas a una actividad glucocorticoide intensificada, bien por sí sola o bien conjuntamente con otros factores, no sólo son detectables en su fisonomía al afectar a su crecimiento, sino que trascienden a ésta para comprometer también al metabolismo óseo. Asimismo, desde una perspectiva antropológica, nuestros datos manifiestan la existencia de dos constituyentes minerales, cinc y magnesio,

cuya alteración de su contenido en hueso se relaciona con un efecto específico del ruido y, por consiguiente, se convierten en marcadores de la exposición a ese agente ambiental. Diferente es el caso del estroncio y del bario, los cuales sí pueden considerarse marcadores de estrés inespecífico desde el mismo momento en que la variación que experimentan sus niveles en hueso está mediada por la activación glucocorticoide, denominador común a cualquier estímulo estresante. También el calcio se convierte en un marcador de estrés inespecífico pero sólo a intensidades del estímulo que difícilmente se producen en la naturaleza por lo que, desde un punto de vista práctico, no resulta un indicador eficaz.

En relación precisamente con el cinc, vamos a continuación a retomar los resultados a él concerniente para discutirlos desde otro punto de vista. Ya vimos que su concentración en el hueso se elevaba sólo en las ratas expuestas al ruido lo que nos conducía a pensar, como hemos dicho, en un efecto asociado a nuestro modelo de estrés y no relacionado con una posible acción glucocorticoide. Sin embargo, su significado biológico resultaba desconocido para nosotros. Desde una perspectiva antropológica, los elevados niveles de cinc en el hueso de estos animales pueden contribuir a matizar la interpretación que tradicionalmente se ha hecho de la presencia de este elemento en los restos óseos de poblaciones humanas. La investigación antropológica sobre la subsistencia de los grupos de población, se sustenta en el hecho de que ciertas categorías de alimentos difieren entre sí en aspectos específicos de su composición, que aparecen reflejados en la composición química de los huesos. Particularmente, un elevado contenido de cinc en los mismos se ha asociado al consumo de dietas ricas en proteínas (dietas cárnicas) (**Buikstra y cols., 1989**).

Encontrar una mayor cantidad de este elemento en el hueso de los animales estresados implicaría, según lo dicho, que habrían ingerido unas concentraciones de cinc superiores a las de los animales de los otros tratamientos, y no fue ese el caso. Todas nuestras ratas consumieron el mismo tipo de dieta (carente de aditivos y con una composición equilibrada de todos los nutrientes necesarios). Pero ¿podría suceder que, aun ingiriendo la misma cantidad de alimento, el ruido ejerciera una acción sobre la absorción intestinal y/o reabsorción renal de ese mineral específico favoreciendo su incorporación/retención en el organismo?. En esta cuestión se halla la razón por la que esa interpretación que hacen los investigadores que trabajan sobre restos óseos puede no ajustarse a la realidad y es que ellos no tienen acceso a otros puntos de control de los niveles circulantes de nutrientes más que el propio resto óseo de su estudio. Por el contrario, los fisiólogos y otros investigadores

podemos cuantificar no sólo la ingesta de alimento sino también su absorción intestinal y su excreción urinaria, además de la deposición de iones en el hueso. O bien conocer si hay una alteración de los parámetros reguladores de dichos procesos, ampliamente conocidos y de carácter endocrino.

La implicación de los procesos de absorción intestinal y excreción renal, así como de su regulación endocrina, a la hora de discutir la presencia en el hueso de elementos minerales debe, por consiguiente, ser tomada en cuenta para explicar el resultado obtenido. Sin olvidar, además, las interacciones de carácter sinérgico o antagónico que se establecen entre elementos, no sólo durante la etapa de absorción intestinal sino también durante la fase de deposición en los tejidos. A este respecto, **Larsen y Sandström (1992a)** observan en ratas que la absorción de cinc se reduce después de la adición de calcio a la dieta. Estos mismos autores (**Larsen y Sandström, 1992b**) constatan una correlación inversa entre la absorción intestinal de calcio, hierro y cobre, y los niveles de cinc en el fémur, mientras que por el contrario fue positiva entre este último elemento y el fósforo (**Larsen, 1993**).

En nuestro caso, como ya hemos dicho, la relación que se establece entre la alteración del contenido de cinc en el hueso y la exposición a un factor ambiental como el ruido, no resulta aparentemente mediada por la actividad glucocorticoide. Esto hace que dicha modificación sea un efecto muy específico de la exposición a este modelo de estrés, que podría estar ejerciéndose sobre esos puntos de control de las concentraciones de este ión. De forma que, aun ingiriendo la misma concentración de cinc que los animales de los otros tratamientos, de favorecerse su absorción intestinal y/o reducirse su excreción renal se produciría un aumento de sus niveles circulantes y ello conduciría, a su vez, a una mayor deposición en el hueso para tratar de mantener unos niveles basales de cinc en sangre pero no puede descartarse, con los datos disponibles, que la acción no sea exclusiva sobre el hueso reduciéndose sin más su concentración en sangre. Tampoco podemos aventurar qué mecanismo implicado en el ruido, y ajeno a la activación hipófiso-adrenal y a la actividad glucocorticoide, produce este efecto.

A este respecto, si bien nosotros no hemos evaluado en el presente trabajo la absorción o excreción de cinc, sabemos que los mecanismos reguladores de estos procesos son, como hemos dicho, de naturaleza endocrina y que, a su vez, se hallan regulados a nivel central hipotalamicamente. Su alteración por el ruido obedecería pues a que la

integración nerviosa del estímulo disparase la función hipotalámica como hace con el eje HHA. Pero, entonces, el desencadenamiento de cualquiera de esos mecanismos en el hipotálamo estaría normalmente relacionado con la actividad de ese eje y, sin embargo, los cambios observados en el contenido óseo de cinc no demuestran dicha relación.

En cualquier caso, el hecho es que la exposición del sujeto a ruido modifica específicamente el contenido óseo de cinc por el procedimiento que sea partiendo de una dieta estándar que es igual para todos los animales. Luego esto mismo podría ocurrir entre dos poblaciones humanas con el mismo consumo dietético.

Por otra parte y con independencia del mecanismo mediador de esta modificación específica del contenido de cinc por la exposición a este factor ambiental, su importancia estriba, desde el punto de vista de la Antropología y ciencias afines, en que se convierte en un marcador indeleble de la exposición a este agente en los restos óseos de poblaciones humanas o animales y, por consiguiente, en una referencia para los investigadores que estudian estos restos, proporcionándoles una valiosa información adicional a la hora de caracterizar las poblaciones en estudio a las que pertenecen dichos restos. No es nuevo que la constitución química del hueso es un registro de señales acerca del ambiente en que un individuo se halla inmerso, habiéndose empleado en determinaciones cronológicas, en el estudio del proceso de fosilización o en el de ambientes y climas pasados (**Price, 1989**). Por lo tanto, el hueso al formar parte en un momento dado de un ser vivo, estuvo influido metabólicamente, hormonal, nutricional y bioquímicamente por un organismo que, a su vez, respondió a un **ambiente físico**. Sin embargo puede haber otros estímulos ambientales, además de la dieta y el ruido, que reproduzcan este efecto.

No queremos concluir aquí la discusión de estos resultados sin exponer otra posible interpretación de los mismos, aunque con un planteamiento alejado de nuestros objetivos. Son numerosos los estudios que han establecido la contribución de ciertos elementos, especialmente sodio, potasio, calcio y magnesio, a la etiología, prevención y tratamiento de la hipertensión arterial. Uno de estos estudios (**Leblondel y Allain, 1988b**) constata la existencia de modificaciones de las concentraciones tisulares de diversos elementos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Otros investigadores inciden en esta misma idea a través de estudios que muestran como la deficiencia de calcio, magnesio o cobre en la dieta conduce a un aumento de la presión arterial en ratas (**Altura y cols., 1984; Schleiffer y cols.,**

1984; Medeiros, 1987) o bien destacan el efecto preventivo de la hipertensión que posee el consumo de dietas suplementadas con calcio o potasio (Sato y cols., 1991; Semafuko y Morris, 1991). A pesar de que todos estos datos convergen en la existencia de una relación entre el balance de ciertos elementos y la hipertensión arterial, se desconoce cuál o cuáles son los mecanismos por los que esta relación se hace efectiva, aun cuando todo parece apuntar hacia una alteración de su metabolismo (Parrot-Garcia y McCarron, 1984; McCarron, 1989; Pernot y cols., 1991) y, por lo tanto, quedarían implicados en mayor o menor grado todos aquellos factores que convergen en él.

Estos antecedentes, los resultados aquí expuestos relativos a una modificación de la homeostasis de algunos de los elementos analizados y el conocimiento por estudios previos de que nuestros tratamientos experimentales generan hipertensión arterial en las ratas, nos conducen a no descartar que los glucocorticoides, además de un probable efecto potenciador de las acciones de factores presores, fueran también responsables de los efectos hipertensivos observados en nuestros animales a través de la modificación del metabolismo de ciertos elementos con una función crítica en la fisiología cardíaca y vascular.

Como vemos, este esbozo de discusión se aleja de los objetivos de esta Tesis, aunque por su relación con otra de nuestras áreas de investigación y por su interés en un futuro, no hemos podido resistir la siempre atractiva tentación de "recrearse" desde nuevas perspectivas en los resultados obtenidos.

5.2. ESTADISTICA MULTIVARIANTE DE LOS CONSTITUYENTES MINERALES DEL HUESO

Nuevamente acudimos a la estadística multivariante como una "herramienta" eficaz con la que caracterizar y diferenciar nuestros grupos experimentales atendiendo, en este caso, al contenido mineral de sus huesos. Indirectamente va a facilitarnos el manejo de los resultados obtenidos pues, como ya hemos mencionado, su propio desarrollo conlleva una reducción del número de parámetros originales sin que se produzca una pérdida notable de información.

Por otra parte, a estas alturas de la discusión, muchos de los conceptos

asociados a esta prueba de análisis estadístico nos resultan ya familiares por lo que abordaremos la discusión de estos resultados concretos de forma más directa.

5.2.1. ANALISIS FACTORIAL: ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Una vez cerciorados de que los constituyentes minerales en estudio se hallan altamente correlacionados, procedemos a llevar a cabo este análisis.

MATRIZ DE CORRELACION							
	Ca	P	Mg	Zn	Ba	Sr	Fe
Ca	1.00000						
P	-0.63860	1.00000					
Mg	-0.68053	0.60669	1.00000				
Zn	0.04108	0.05838	-0.25528	1.00000			
Ba	0.27697	-0.23626	-0.46832	-0.05955	1.00000		
Sr	-0.15645	0.19149	-0.13535	0.20289	0.63935	1.00000	
Fe	-0.41522	0.15968	0.13550	-0.09571	-0.32752	-0.01191	1.00000

Tabla 26: Matriz de correlación entre los constituyentes minerales.

En la Tabla 27 se muestra la matriz factorial rotada. Podemos observar que el análisis de componentes principales conserva tres factores que conjuntamente explican el 77% de la variabilidad de la muestra. Se consigue así reducir los ocho parámetros de partida a tres con una pérdida mínima de información.

MATRIZ FACTORIAL ROTADA			
	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Calcio	-0.90990	-0.03741	0.01924
Fósforo	0.84302	0.11288	0.10359
Magnesio	0.80503	-0.22787	-0.29208
Hierro	0.43618	-0.22397	0.02806
Estroncio	0.16902	0.91096	0.20170
Bario	-0.37830	0.87405	-0.13656
Cinc	-0.03920	0.04271	0.98071

Tabla27: Matriz factorial rotada.

Además, la matriz factorial rotada nos proporciona información adicional al indicarnos el peso que cada constituyente mineral asigna a cada factor, de modo que el calcio, el fósforo, el magnesio y el hierro se asocian al factor 1. El estroncio y el bario lo hacen al factor 2 y, por último, el cinc al factor 3. Recordemos que los constituyentes minerales con pesos elevados para el mismo factor aparecen agrupados, y son los efectos que los tratamientos ejercen sobre ellos los que hacen posible la caracterización y diferenciación entre los grupos de individuos.

Antes de iniciar la discusión de estos resultados, vamos a comentar el significado de estas agrupaciones de elementos.

Observamos que al factor 1 aparecen asociados cuatro constituyente minerales: calcio, fósforo, magnesio y hierro. Este factor es el que explica el mayor porcentaje de la variabilidad muestral (38%), lo cual indica que los efectos por él representados son los determinantes en mayor grado de la caracterización y diferenciación de los grupos.

La relación matemática que el ACP establece entre el calcio y el magnesio asociándolos en un mismo factor, puede entenderse desde el punto de vista de que la

actividad glucocorticoide de los tratamientos es el elemento mediador común de las variaciones que experimenta su contenido en el hueso. Ya dijimos, en el estudio univariante, que el aumento del contenido óseo de calcio es mediado por la actividad glucocorticoide si bien se requieren elevadas intensidades para conseguir un efecto estadísticamente significativo. En lo que concierne al magnesio, comentamos que en su reducción estaría implicada la activación hipófiso-adrenal (corticotesterona o ACTH), a la cual se le sumaría una acción propia del ruido.

Por lo que respecta a la asociación del fósforo y del hierro al mismo factor que los otros dos constituyentes mencionados, no era lo esperado por nosotros a la luz de los resultados univariantes. Esos resultados nos indicaban que nuestros tratamientos no eran capaces de ejercer ningún efecto sobre su contenido. Por consiguiente, lo más lógico sería haber encontrado al fósforo y al hierro asociados juntos en un factor diferente. Pero, quizás, lo que nos quiera indicar esta asociación es que la actividad glucocorticoide de los tratamientos de forma general se distingue por sus acciones sobre el calcio y el magnesio, y por la ausencia de ningún efecto sobre el hierro y el fósforo. Por otra parte, cuando consideremos los efectos representados por los restantes factores veremos que la asociación de estos constituyentes a cualquiera de ellos resulta más inadecuado.

El segundo factor extraído por el ACP lleva asociados los constituyentes minerales estroncio y bario. La extracción de este factor en segundo lugar indica que los efectos que representa contribuyen en menor medida a la caracterización de los grupos y así explica el 23% de la variabilidad de la muestra. La asociación de estos dos constituyentes a un mismo factor resulta coherente con el comportamiento similar que exhiben. Recordemos que el contenido óseo de ambos aumenta mediado por la actividad glucocorticoide sin que detectemos una acción específica debida a posibles factores contenidos en el ruido, y que ambos alcanzan ya a la intensidad del tratamiento estresante su umbral de depósito óseo.

El tercer factor es el que menor porcentaje de la variabilidad de la muestra explica (15%), comprende un único constituyente, el cinc, que queda de esta forma destacado del resto. Ya vimos que el comportamiento de este constituyente es completamente ajeno a la acción glucocorticoide. El aumento de su contenido en el hueso es un efecto específico del ruido mediado, bien por un eje endocrino diferente del eje HHA pero asimismo desencadenado por el estrés, bien por factores de naturaleza neurógena activados durante el proceso de integración del estímulo sonoro y que no somos capaces de hipotetizar.

Vamos a continuación a discutir la información que se desprende de las posiciones relativas que ocupan los individuos de los diferentes grupos experimentales, las cuales se muestran en la Figura 21 a, b y c.

Comenzaremos con la representación gráfica que nos proporciona mayor información y que corresponde a las posiciones de los individuos en la combinación de factores 1 y 2.

Analicemos en primer lugar la distribución de los animales atendiendo a los efectos de los tratamientos sobre el contenido óseo de calcio, magnesio, fósforo y hierro, asociados todos ellos al factor 1.

En primer lugar resulta obvio que, por lo ya comentado en el estudio univariante, la posición de los individuos en relación a su menor o mayor contenido de fósforo y de hierro sólo puede interpretarse como una dispersión de los mismos en respuesta a la individualidad que los caracteriza.

Por el contrario, sí cabe hablar de una posición de los animales condicionada por el efecto de los tratamientos sobre el contenido óseo de calcio y magnesio. Para discutir dicha posición, es importante señalar que las coordenadas del calcio son negativas para el eje factorial 1, mientras que las del magnesio son positivas para ese mismo eje. Una vez dicho esto, observamos que podemos definir tres bandas verticales en las que se agrupan los individuos. Cada una de ellas tiene su eje central horizontal en el factor 1.

En la banda de la izquierda se localiza el 60% de los individuos del grupo DxStr. Son ellos, por tanto, los que presentan los mayores niveles de calcio. Compartiendo dicha posición, encontramos un 20% de animales del grupo Str así como el mismo porcentaje del grupo Dx. Esta presencia minoritaria tiene su explicación en la propia individualidad de los sujetos en estudio. La banda de la derecha comprende el 67% de los controles que muestran así los valores mayores para el magnesio. Nuevamente hallamos la presencia minoritaria de un 14% de animales del grupo ACTH y un 20% del grupo estrés. Por su parte, la banda central recoge la mayor parte de los individuos, señalando con dicha posición que adquieren para el calcio y el magnesio valores intermedios a los referidos.

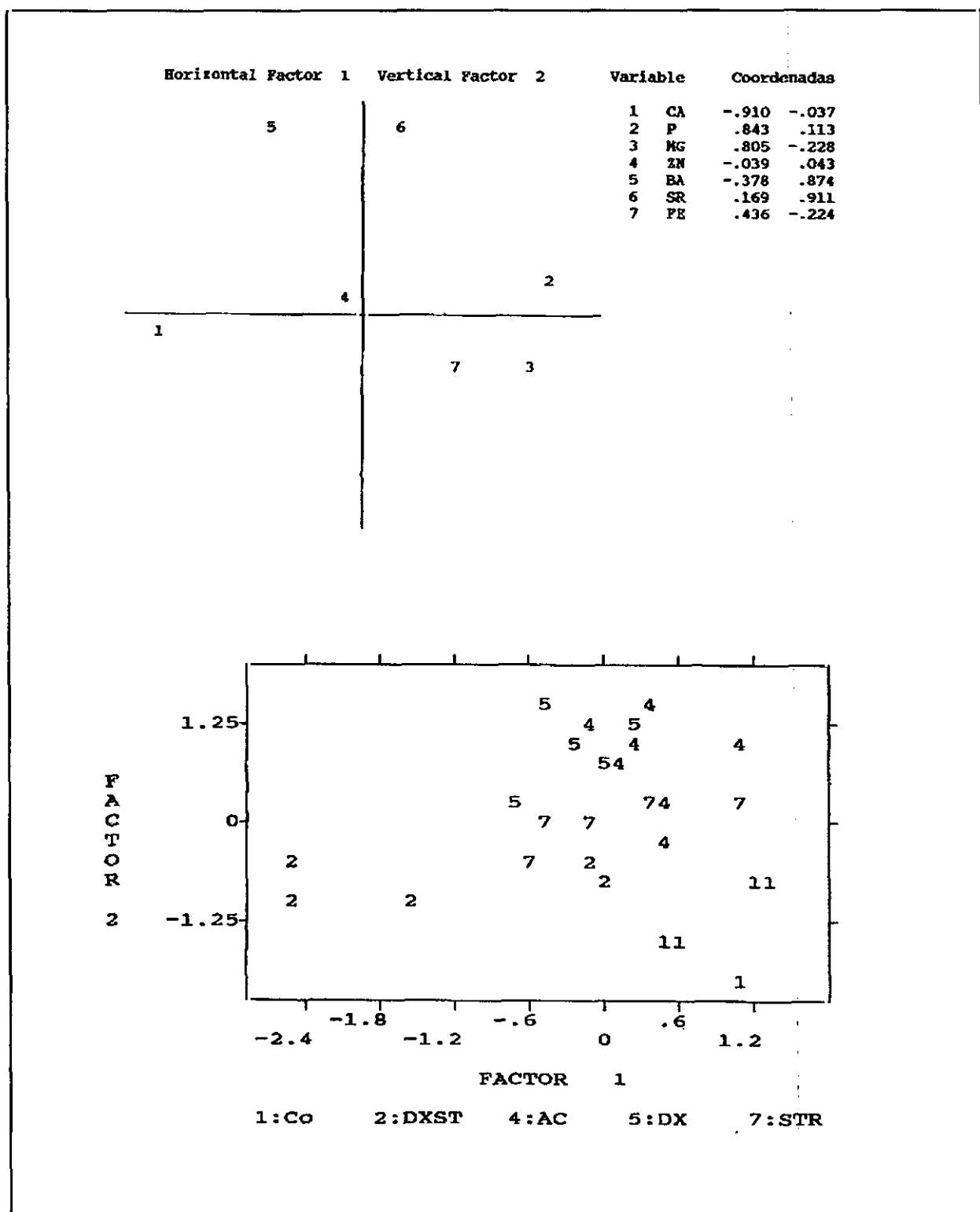


Figura 21 a: Representación gráfica de la combinación de factores.

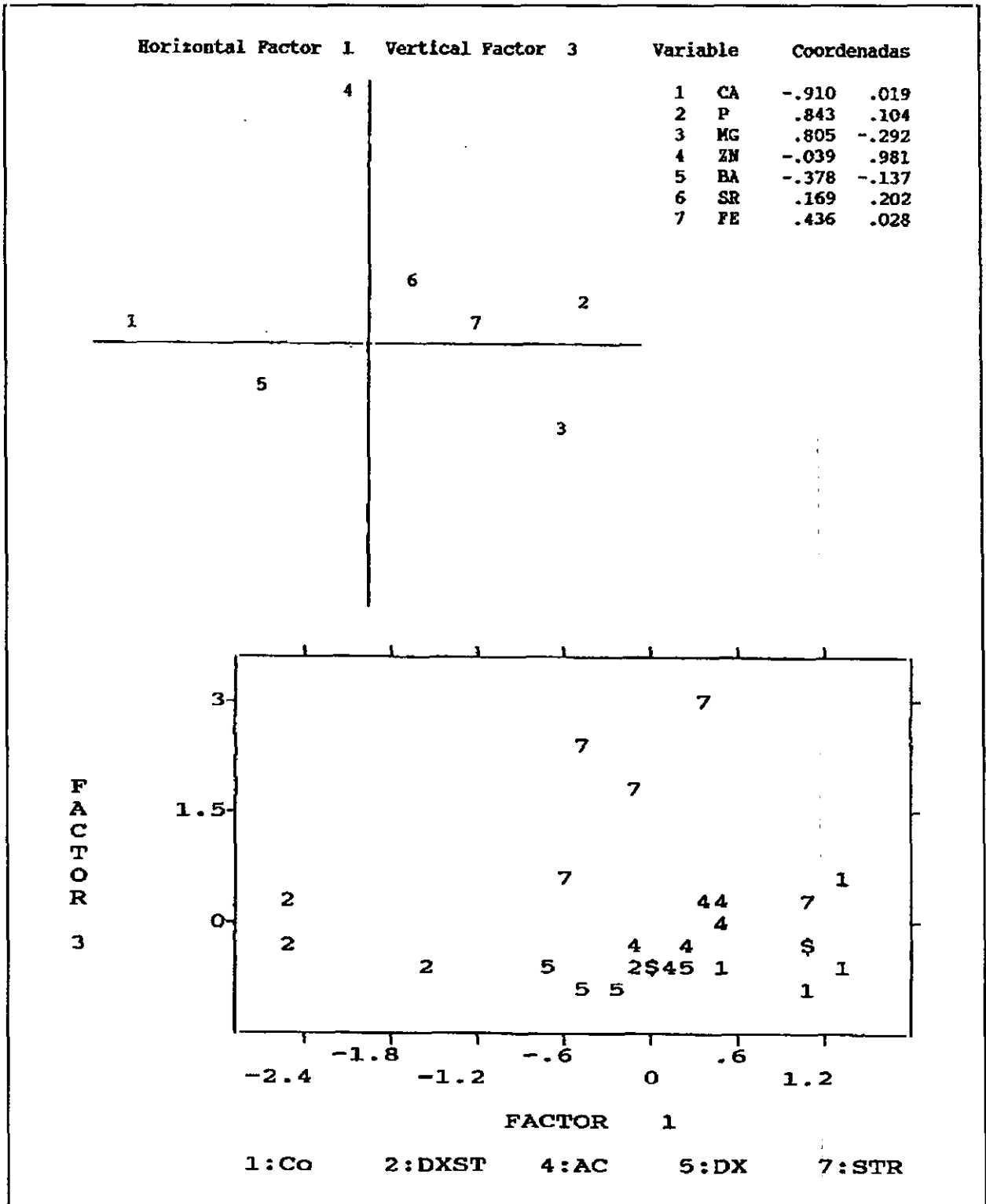


Figura 21 b: Representación gráfica de la combinación de factores.

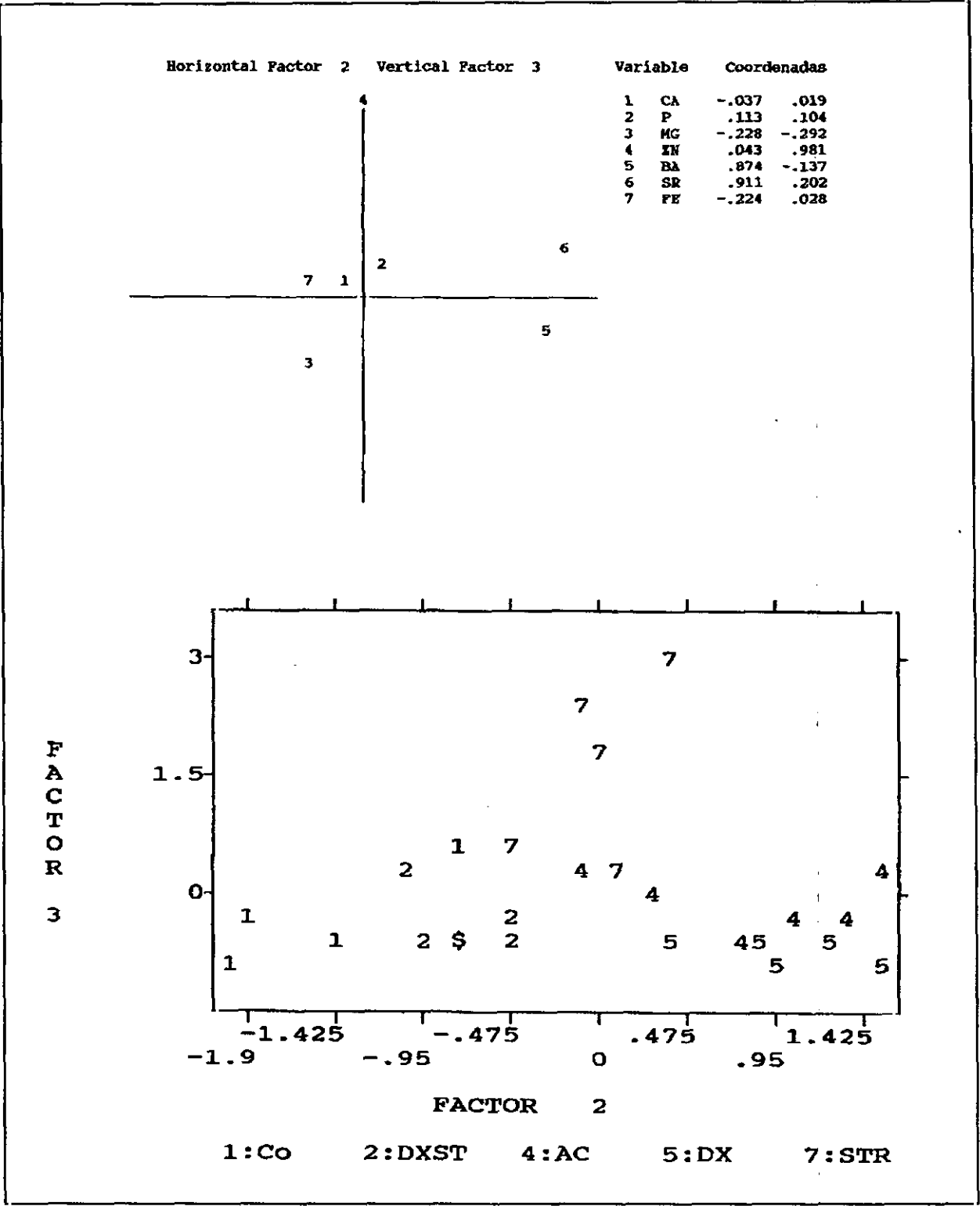


Figura 21 c: Representación gráfica de la combinación de factores.

Por otra parte, la imposibilidad de diferenciar espacialmente los animales de la banda central en grupos definidos está corroborando también los resultados univariantes. Dichos resultados señalaban que en el caso del calcio sólo se observaba un aumento significativo con el tratamiento conjunto de dexametasona y estrés, mientras que, por el contrario, en el caso del magnesio el tratamiento estresante conseguía ya la máxima variación de su contenido óseo. En consecuencia, como manifiesta su posición, los animales de los grupos Str, Ac y Dx no presentan, entre sí, valores muy diferentes para ambos constituyentes.

Vamos a continuación a analizar la distribución de los animales en función de los efectos indicados por el factor 2. Para ello hacemos un barrido desde la zona superior a la inferior de la misma representación gráfica, definiendo tres bandas horizontales.

La banda superior comprende animales de los grupos Ac y Dx (57% y 60%, respectivamente), cuya posición les asigna elevados niveles de estroncio y bario. En la banda inferior encontramos el 67% de los animales controles así como dos individuos del grupo DxStr (40%) que se comportan, por consiguiente, como si fueran animales no tratados. Por último, la banda central recoge todos los individuos del grupo Str, lo cual indica que presentan valores intermedios para el estroncio y el bario. Conjuntamente con ellos aparecen mezclados animales de todos los otros grupos, si bien en un porcentaje minoritario.

Esta mezcla de individuos pertenecientes a todos los grupos en la banda central confirma los datos del estudio univariante cuando encontrábamos que el tratamiento con estrés conseguía la saturación del efecto sobre el contenido óseo de estos dos constituyentes. Por lo tanto, los valores de ambos elementos difieren poco de unos a otros grupos de animales. Sin embargo, este hecho no impide que apreciemos una cierta polaridad en la distribución de los mismos atendiendo a la creciente acción glucocorticoide de nuestros tratamientos. Precisamente es en esta representación donde podíamos pensar que se manifestase más fácilmente tal gradación ya que el factor 2 asocia dos constituyentes, estroncio y bario, cuyas alteraciones sí resultan mediadas más claramente por dicha acción glucocorticoide.

Vamos seguidamente a analizar la distribución de los individuos en la representación que combina los factores 1 y 3. Nos centraremos en la discusión de la

disposición de los animales atendiendo a los efectos asociados al factor 3, ya que respecto al factor 1 se reproduce la distribución analizada anteriormente.

Observamos que los individuos estresados se dispersan hacia la zona superior de la gráfica en el sentido indicado por el eje factorial 3. Dicha posición asigna a estos animales un elevado contenido óseo de cinc que es el constituyente que aparece asociado a dicho factor. El resto de los animales tratados quedan relegados en torno al eje horizontal, junto con los individuos controles, lo cual señala que todos estos animales se comportan como no afectados. No se observa, por otra parte, una polaridad en la posición de estos individuos de acuerdo con la actividad glucocorticoide representada por cada tratamiento.

Estos resultados confirman los del estudio univariante al concluir que los animales estresados se diferencian e identifican de manera específica por presentar elevados niveles de cinc, y que la actividad glucocorticoide no es el elemento mediador de ese aumento.

Observamos de esta forma que aunque el factor 3, y por consiguiente los efectos por él representados, es el que menos contribuye a explicar la variabilidad de la muestra total, sin embargo resulta determinante en lo que concierne a la caracterización del grupo estrés.

Por último nos queda analizar las posiciones de los individuos en la representación gráfica de los factores 2 y 3. Si nos fijamos en las posiciones de los mismos atendiendo al factor 2, vemos que se reproduce la distribución ya comentada anteriormente. Lo único destacable es la dispersión que muestran los animales del grupo Str hacia la parte superior de la gráfica, o lo que es lo mismo, en el sentido del eje factorial 3. Por consiguiente, la posición espacial de esos animales refleja, una vez más, que muestran un elevado contenido de cinc.

En conclusión, de toda la información proporcionada por el ACP vemos que sólo dos de los grupos de animales, los expuestos al ruido y los del tratamiento conjunto, pueden caracterizarse y diferenciarse claramente del resto. En realidad, este hecho está poniendo de manifiesto, al igual que el análisis univariante, la ausencia de un patrón común subyacente a los efectos observados sobre el contenido mineral del hueso.

Por otra parte, teniendo en cuenta esa observación, y considerando tanto la información proporcionada por el estudio univariante como por el ACP, podemos proponer ciertas pautas en relación a como deberíamos abordar en el futuro un trabajo de estas características con independencia de la estirpe, sexo o edad de los animales utilizados. Decimos esto último porque, a diferencia de las variables craneométricas y de aquéllas que hacían referencia a los órganos, el comportamiento diferencial que muestran los elementos minerales estudiados no guarda relación con el crecimiento sino que debería relacionarse más con efectos específicos de la actividad glucocorticoide o de la propia exposición al ruido sobre el metabolismo y, por lo tanto, representa más al patrón de acción de los tratamientos que al patrón de crecimiento característico del tipo de animal.

En el diseño de esos estudios, el conjunto de elementos a evaluar puede reducirse a aquellos que son imprescindibles cuantificar en cada grupo experimental por ser ellos los que lo caracterizan. Todo ello supone una facilitación del trabajo, algo siempre deseable.

En primer lugar resulta obvio que la cuantificación del contenido óseo de hierro y fósforo no permite caracterizar los efectos de nuestros tratamientos, puesto que ninguno de estos constituyentes resulta alterado. Por lo tanto, los niveles que presentan los sujetos en estudio serán una manifestación de su propia individualidad. No deben por consiguiente ser considerados como marcadores de estrés ambiental ni específico ni inespecífico.

La evaluación del contenido de bario y estroncio tampoco permite diferenciar entre sí los diferentes tratamientos. Ello no obedece, a diferencia de lo que sucede con el fósforo y el hierro, a la ausencia de efecto por nuestros tratamientos, sino a que ambos minerales alcanzan un techo de su depósito en hueso a una intensidad glucocorticoide tan moderada como la representada por la exposición al ruido. Sin embargo, esa mediación por la actividad glucocorticoide de la variación de sus niveles, los hace válidos como marcadores de la exposición de individuos o poblaciones a estrés ambiental inespecífico de carácter moderado.

Por su parte, la cuantificación del contenido de calcio contribuye a caracterizar y diferenciar sólo tratamientos o situaciones cuya actividad glucocorticoide adquiere intensidades elevadas, ya que es en el tratamiento conjunto (DxStr) de actividad

glucocorticoide mayor donde encontramos una alteración de su contenido. Además, se convierte en un marcador de estrés inespecífico como dijimos para el estroncio y el bario, si bien sólo en situaciones en las que sus niveles alcanzan una magnitud tan elevada que resultan altamente improbables en la vida cotidiana del sujeto.

La medida de los niveles óseos de magnesio contribuye asimismo a caracterizar nuestros tratamientos. Sin embargo no podemos determinar, con nuestros datos, si dicha caracterización puede extenderse a situaciones o tratamientos de intensidad glucocorticoide mayor que la representada por la administración de ACTH, ya que intensidades superiores como la correspondiente a la administración de dexametasona no causó efecto alguno. En cualquier caso, el contenido de magnesio en el hueso se convierte en un marcador de estrés ambiental inespecífico al ser mediada su variación por la actividad hipófiso-adrenal. Además, al observarse un efecto propio del ruido sobre su contenido, también puede ser considerado como un marcador específico de la exposición de individuos o poblaciones a ese factor ambiental.

Por otra parte, el contenido óseo de cinc se relaciona ampliamente con el consumo de dietas ricas en un aporte cárnico y, consecuentemente, se emplea como un indicador óseo de dicho consumo. A la vista de tal consideración no excluimos que tanto los niveles en hueso de cinc como de magnesio puedan ser considerados como marcadores específicos de otros factores que permanecen aún sin analizar y cuya incidencia deberá ser tomada en cuenta a la hora de explicar la variación de estos u otros constituyentes en el hueso.

V. DISCUSION GLOBAL

V. DISCUSION GLOBAL

La estimulación directa con ruido produce un aumento de los niveles circulantes de corticosterona, lo cual pone de manifiesto una activación del eje HHA que afecta, una vez producida la integración sensorial del estímulo, a todos y cada uno de sus niveles: hipotálamo, hipófisis y glándulas adrenales. Esta activación corticoadrenal generada por el estrés no consigue modificar significativamente una serie de parámetros de carácter general o global, tales como la ganancia de peso de los animales y su evolución temporal, los depósitos de grasa subcutánea, la ingesta absoluta y relativa, y las dimensiones corporales.

Estos resultados no invalidan un efecto sistémico significativo de la mayor corticosterona circulante en este modelo de estrés, que nosotros mismos corroboramos en estudios previos al encontrar en los animales expuestos al ruido una reducción del contenido hepático de glucógeno (Velasco, 1990; Alario, 1991), sino que vienen a indicarnos que la activación corticoadrenal por el ruido no es suficiente para generar una repercusión significativa sobre el crecimiento global del animal, lo cual redundará en el carácter moderado de nuestro modelo de estrés.

Efectivamente, la intensidad del modelo estresante utilizado es moderada, motivo por el cual no podemos hablar de acciones generalizadas pero, cuando profundizamos en nuestro estudio y nos circunscribimos al nivel de los compartimentos del animal, encontramos que la activación corticoadrenal generada por el estrés sí consigue una reducción del crecimiento de los órganos y del cráneo de los animales. Esta reducción, aun cuando moderada, confirma que efectivamente hay una repercusión y que si no se manifiesta en el animal es porque esos efectos quedan diluidos en la totalidad del individuo.

Esa acción glucocorticoide sobre el crecimiento se traduce en el caso del encéfalo en aplasia y atrofia de sus células, con la consiguiente reducción de su peso. Además, encontramos que ese efecto atrófico sobre el encéfalo no sólo responde a la actividad

glucocorticoide, como lo indica el que se reproduzca en los restantes tratamientos, sino también a una acción que resulta de la propia integración sensorial del ruido y que se manifiesta cuando a los animales se les estresa después de administrárseles dexametasona. El corazón y el riñón de los animales estresados muestran una reducción significativa de su crecimiento únicamente por efectos aplásicos. La ausencia de atrofia de las células de estos dos órganos es una manifestación más de la moderación de los efectos del modelo estresante utilizado, pero también es indicativo de unos órganos cuyo crecimiento ha alcanzado a esta edad de los animales un grado de estabilidad tal que resulta poco susceptible a ser reducido.

Esas circunstancias explican que el peso del corazón y del riñón no se reduzca de una forma significativa. A ellas debe sumarse, en relación al corazón, un efecto hipertrófico que se detecta claramente en los animales expuestos al ruido tras la administración de dexametasona. Esta hipertrofia del corazón se debe a la activación neurógena crónica de la exposición al estrés y posee una finalidad bien definida, relacionada con la elaboración de una respuesta de "huida o lucha" del animal frente al estímulo estresante (Reacción de Alarma del SGA). Obviamente, el carácter crónico de la exposición al ruido de nuestros animales hace que el efecto carditrófico observado pierda ese carácter adaptativo. Puede entonces entenderse como un factor amortiguador, en situaciones estresantes moderadas, como en nuestro caso, de los efectos aplásicos sobre el corazón debidos a los glucocorticoides.

El cráneo de nuestros animales estresados es otro exponente de la acción reductora de los glucocorticoides sobre el crecimiento, pero tampoco escapa a la moderación del agente utilizado que impide una reducción significativa de las variables craneométricas consideradas. Sin embargo, cuando estas variables se relacionan entre sí a través de índices se observan variaciones significativas que nos proporcionan una valiosa información que de otra forma quedaría enmascarada. El análisis de estos índices nos señala ya, a esta intensidad de acción glucocorticoide, las regiones anatómicas del cráneo con una mayor predisposición al efecto reductor de los glucocorticoides sobre el crecimiento, y que si no resultan reducidas de forma significativa se debe únicamente a la moderación del estrés ya que, como veremos, a intensidades superiores, representadas por los siguientes tratamientos, esas regiones "anticipadas" muestran en efecto una reducción de su crecimiento.

Así encontramos que, a la intensidad glucocorticoide del tratamiento

estresante, las variables cuyo crecimiento resulta más sensible a reducirse se relacionan con la región cigomática y con la longitud del neurocráneo. La consideración de esta última dimensión merece una mención especial pues está apoyada por la variación significativa del índice que la contiene. Asimismo, en el análisis multivariante (ACP) encontramos un apoyo al crecimiento menos estabilizado de esas variables, ya que su asociación al factor que explica el mayor porcentaje de la variabilidad muestral indica que es en la zona cigomática y en la longitud del neurocráneo donde los efectos reductores del crecimiento del cráneo se centran de una forma especial. Ello ya es indicativo de cuál es el patrón de crecimiento craneal a la edad de los animales utilizados en el estudio (púberes).

También el ACP nos permite confirmar de una forma gráfica que los animales expuestos al ruido constituyen un grupo diferenciable del control en cuanto a los efectos reductores de los glucocorticoides sobre el crecimiento del cráneo. El 66.7% de los animales estresados ocupan una posición precisa y representativa del efecto debido a la exposición al ruido. Este efecto se traduce en un cráneo más corto y/o con arcos cigomáticos menos desarrollados que los animales controles y siempre de acuerdo con una actividad glucocorticoide moderada.

Es interesante, en relación con la estructura ósea de los animales estresados, comentar el reforzamiento de la región occipital (sustentado por el aumento significativo de la longitud cóndilo-basal y de la profundidad y separación condílea) donde se insertan los músculos nucales y cervicales. Lógicamente, esta remodelación ósea local está potenciada por una superior actividad de esos músculos.

Este efecto de reforzamiento no lo hemos encontrado en otros modelos de estrés de similar intensidad no incorporados al presente trabajo y sólo se detecta en este tratamiento, descartándose por lo tanto una implicación de los glucocorticoides, lo que dirige nuestra atención hacia una probable respuesta motora refleja (contracciones isométricas) del animal frente a la "entrada" de estímulos medioambientales, permitiéndole adquirir un estado de alerta o de atención a través de la orientación de la cabeza, y por consiguiente de los pabellones auditivos, en dirección a la fuente del estímulo sonoro que podría representar una amenaza.

Por otra parte, este efecto de reforzamiento occipital ha de tenerse muy

en cuenta a la hora de interpretar los resultados craneométricos ya que puede estar impidiendo que aquellas variables, que en su definición comprenden a la totalidad o parte de la región occipital, lleguen a mostrar una reducción significativa. Dichas variables serían objeto de dos efectos contrapuestos, de un lado, la reducción de sus dimensiones mediada por los glucocorticoides y, de otro, un aumento de su valor a resultas del reforzamiento occipital mencionado.

Como hemos dicho, el carácter moderado del ruido determina una ambigüedad de los resultados en el sentido de que gran parte de ellos se mueven en el límite de la significación estadística. Así lo hemos visto en lo comentado hasta el momento. Era de esperar, por lo tanto, que una reducción tan moderada del crecimiento del cráneo no se expresase en el peso del mismo. Mas no fue así, el peso craneal de estos animales estresados se reduce indicando que están perdiendo masa ósea. Podríamos presuponer que dicha menor masa ósea fuese consecuencia de una desmineralización del hueso ya que, como hemos apuntado, no cabe responsabilizar de ese efecto a una menor crecimiento craneal si nos atenemos estrictamente a las dimensiones del cráneo. Sin embargo, en estos animales estresados no se detecta una pérdida de minerales sino que, por el contrario, se observa una mayor mineralización que afecta al contenido de estroncio, bario y cinc, y que discutiremos más adelante. En consecuencia, si la pérdida de masa ósea no se acompaña de menores niveles de minerales, y por lo tanto, no influye sobre la matriz inorgánica del hueso, podemos pensar con más convencimiento en un efecto inhibitor sobre la fracción celular del mismo. Así, el hueso de estos animales sería un tejido de crecimiento estabilizado, o incluso en franco retroceso, y mineralizado en exceso. Esta deducción nos estaría a su vez argumentando la existencia de un efecto reductor del crecimiento óseo aun cuando no se manifieste claramente en las dimensiones craneales o corporales debido al carácter moderado del tratamiento estresante.

Como veremos en los tratamientos de mayor intensidad glucocorticoide, la reducción significativa no sólo del peso craneal, sino también del crecimiento del cráneo y de las dimensiones corporales de los animales nos apoyarán esa acción inhibitor sobre el componente celular del hueso, con independencia de las alteraciones que pueda sufrir el componente mineral del mismo.

Retomamos a continuación la discusión referente al contenido mineral

del hueso de estos animales. La mayor mineralización que observamos se debe al aumento de los niveles de cinc, estroncio y bario, si bien distinguimos que la acción glucocorticoide no es en todos los casos el mediador de ese aumento. El contenido de cinc aumenta exclusivamente en los animales estresados por lo que, descartada una acción glucocorticoide, este efecto debe ser atribuido a un efecto propio del ruido como tal estímulo sonoro. El aumento experimentado por el estroncio y el bario sí se reproduce en los restantes tratamientos pero, como veremos, no encontramos una correlación entre su intensidad glucocorticoide y sus efectos, probablemente porque el techo de depósito en hueso de estos dos constituyentes se alcanza ya a una intensidad de acción glucocorticoide tan leve como la representada por el estrés.

El contenido óseo de magnesio merece un comentario aparte ya que, por el contrario, sus niveles en hueso son, de los tres constituyentes, los únicos que disminuyen en estos animales. La mediación de este efecto recae en la moderada activación hipófiso-adrenal (corticosterona o ACTH) generada por el estrés, como lo pone de manifiesto que también detectemos una reducción de su contenido en los restantes tratamientos, a excepción de la administración única de dexametasona que comentaremos más tarde. Sin embargo, mencionamos ahora que la dexametasona al no reproducir el efecto de la corticosterona sobre el magnesio, no nos permite determinar si este mineral hubiera alcanzado su techo de depósito a la intensidad del tratamiento con ese glucocorticoide sintético. Necesitaríamos pues exponer los animales a mayores intensidades de estrés o mayores dosis de ACTH. Independientemente de la activación hipófiso-adrenal, observamos además un efecto propio del ruido que se manifiesta claramente en los animales expuestos al estímulo sonoro después de la administración de dexametasona.

A pesar del análisis de estos resultados y de la comparación que se ha hecho entre los diferentes grupos de tratamiento, no hemos encontrado una explicación concluyente al decremento de los niveles de magnesio en el hueso.

Destacamos por último, y a modo de inciso final, todos aquellos efectos que muestran los animales estresados pero que no responden a una acción de los glucocorticoides o que además de obedecer a dicha acción también se deben a una efecto propio del ruido. Corresponden al efecto hipertrófico sobre el corazón por la activación neurógena del estrés, al efecto atrófico del encéfalo por la integración sensorial del estímulo, al efecto de reforzamiento de la región occipital del cráneo por un mayor desarrollo muscular en relación

justifica por el adelgazamiento de los individuos, también su crecimiento se reduce. Las menores dimensiones corporales (longitud y envergadura) que observamos así nos lo señala. Obviamente, la dimensión de longitud que hemos evaluado no tiene el mismo significado que la altura en los estudios antropométricos, ya que no se consideran las extremidades posteriores. De modo que no podemos decir que nuestros animales tienen menor alzada pero sí que son más cortos. Sin embargo, el efecto sobre la envergadura (la cual contempla los huesos largos de la extremidad anterior) nos permite pensar que también la talla o alzada del animal se debe estar alterando.

Este efecto de los glucocorticoides sobre el crecimiento trasciende al animal contemplado en su totalidad, manifestándose también cuando nuestro estudio se centra en otros niveles. Eso es lo que sucede cuando encontramos que el encéfalo de estos animales tratados con ACTH reduce su peso por aplasia y atrofia de sus células, y además de forma más acentuada que en el caso de los animales estresados.

Por el contrario, el peso del corazón y del riñón no se reduce significativamente a pesar de los efectos aplásicos significativos ocasionados por el tratamiento. Ya habíamos visto que los resultados concernientes a los animales estresados apuntaban a un crecimiento más estabilizado de estos dos órganos frente al encéfalo. Por consiguiente, los datos de los animales administrados con ACTH no hacen sino verificar esa apreciación e indicarnos asimismo que esa estabilidad es mayor de lo que podríamos haber pensado en un primer momento, pues ni siquiera una intensidad de acción glucocorticoide superior a la del estrés consigue que el peso del corazón y del riñón manifieste de forma significativa la reducción del crecimiento de estos órganos. Este crecimiento más estable se hace más patente si cabe en el caso del corazón, ya que en estos animales administrados con ACTH no puede considerarse la existencia de un efecto cardiotrófico al que pudiera atribuirse una reducción del crecimiento del corazón menos acentuada de lo esperado.

Más dúctil resulta ser el crecimiento del cráneo, reduciéndose en estos animales de una forma generalizada. Tal y como predecíamos a la vista de los resultados encontrados en los animales expuestos al ruido, las dimensiones relacionadas con los arcos cigomáticos y la longitud del neurocráneo no sólo se reducen de forma significativa sino que, como nos indican los índices, son ellas en efecto las más sensibles al efecto reductor de los glucocorticoides sobre el crecimiento, primando las dimensiones cigomáticas sobre la longitud

del neurocráneo. Les siguen en orden decreciente las variables que definen el resto del esplanocráneo que no es zona cigomática y, por último, la anchura craneal. La mayor estabilidad del crecimiento de cráneo en anchura es confirmada por el ACP y el análisis discriminante, y ambos sugieren además que el crecimiento en altura podría mostrar un comportamiento similar o ser su estabilidad ligeramente menos acentuada que la del crecimiento en anchura.

Así pues, el carácter moderado del tratamiento con ruido es en efecto la causa de que no hayamos encontrado en los animales estresados reducciones significativas de las variables craneométricas consideradas, ni siquiera de aquellas más sensibles a reducirse.

Esta clara reducción del crecimiento del cráneo de estos animales determina una disminución del peso craneal como efectivamente observamos, que supera la mostrada por los animales estresados. Además, estos animales tratados con ACTH muestran, como hemos comentado, una reducción significativa del crecimiento de sus dimensiones corporales. Por consiguiente, con más claridad que en el caso del ruido, podemos hablar de una pérdida de masa del hueso relacionada con un efecto de los glucocorticoides sobre el crecimiento, independientemente de su acción sobre el componente mineral del mismo.

Respecto a este último aspecto, tampoco en estos animales se produce una desmineralización del hueso que pudiera relacionarse con la pérdida de masa ósea al afectarse la matriz inorgánica. Por consiguiente, la menor masa del hueso es consecuencia de un efecto de los glucocorticoides sobre el crecimiento o división celular, que en estos animales ya se detecta claramente en las dimensiones craneales y corporales.

Con independencia de esta hipótesis, vamos a discutir la mayor mineralización que por el contrario sí encontramos y que recae en los niveles de estroncio y bario. El contenido de estos dos constituyentes minerales aumenta en el hueso pero, como ya adelantamos en su momento, este efecto no resulta más acentuado que en los animales estresados. Nuevamente incidimos en que quizás el exceso de corticosterona provocada por el estrés sea suficiente para conseguir el techo de depósito en hueso de estos dos minerales.

Respecto a los niveles de magnesio, vemos que disminuyen al igual que en los animales expuestos al ruido. Pero a diferencia de ellos, vinculamos esta disminución de

su contenido en hueso exclusivamente a la activación hipófiso-adrenal desencadenada por el tratamiento con ACTH. Excluimos, lógicamente, una posible acción propia del ruido ya que no hay activación del SNC. Por otra parte, aludimos nuevamente a la necesidad de exponer los animales a mayores dosis de ACTH si quisiéramos conocer a qué intensidad de acción glucocorticoide alcanza este elemento su máxima capacidad de depósito en el hueso ya que, como dijimos, la administración de dexametasona no ejerce efecto alguno sobre el mismo.

La administración de dexametasona inhibe la producción endógena de corticosterona adrenal. Esta acción lleva implícita la presencia en sangre de elevadas concentraciones de este glucocorticoide por lo que, independientemente de que su procedencia sea exógena, se reproduce lo sucedido en el tratamiento con ruido respecto a un aumento de los niveles circulantes de glucocorticoides. Es obvio, por otra parte, que la dosis de dexametasona administrada y la potencia de su actividad glucocorticoide constituye una diferencia cuantitativa frente a la hormona endógena. Por consiguiente, la intensidad de sus acciones sobre los tejidos serán un reflejo de su elevada actividad como glucocorticoide que supera a la representada por los tratamientos con ruido y ACTH.

Así lo manifiesta la pérdida de peso de los animales, que no sólo se detecta en ciertas semanas, como sucedía en los tratados con ACTH, sino durante todo el período experimental. A dicha pérdida de peso contribuye el marcado adelgazamiento de los animales, cuyos depósitos de grasa subcutánea se reducen en mayor medida que en los animales estresados y tratados con ACTH. Además, dicho adelgazamiento resulta agravado porque los animales sufren un efecto anoréxico que potencia la pérdida efectiva de peso que presentan.

A todas estas acciones, que redundan en el peso de los animales, se suma además una acción glucocorticoide directa de la dexametasona sobre el crecimiento. Los animales administrados con este glucocorticoide sintético muestran dimensiones corporales más reducidas que los animales de los restantes tratamientos, esencialmente en relación a la longitud.

No sólo estos animales son más cortos, también encontramos un efecto reductor del crecimiento sobre sus órganos acorde, además, con la intensidad glucocorticoide representada por la dexametasona. Una manifestación muy clara de lo dicho es la reducción

significativa del peso del corazón y del riñón por efectos aplásicos, a pesar de la resistencia que muestran a ser reducidos en su crecimiento como se ha discutido anteriormente. Por el contrario, los resultados obtenidos en los restantes tratamientos nos han mostrado que el crecimiento del encéfalo no se halla tan estabilizado en este período de edad y, por ello, sería de esperar que en los animales tratados con dexametasona observáramos una reducción del peso del encéfalo aún más marcada que en los tratamientos anteriores a resultas de una mayor aplasia y atrofia de sus células. Sin embargo, el peso del encéfalo de estos animales no difiere de los tratados con ACTH. La respuesta podemos encontrarla en una posible "protección" del encéfalo frente a la acción de la dexametasona, como indica que no hallemos efecto alguno sobre el tamaño de sus células y, por otra parte, que la reducción de su número de células sea menor de lo esperado. Esta "protección" podría guardar relación con el hecho de la presencia en el encéfalo de receptores para glucocorticoides (tipo I y II) que median diferentes respuestas de estas hormonas y que presentan diferente afinidad por la dexametasona.

Así, de todo lo comentado en relación a los órganos, puede resumirse finalmente que la atrofia de las células del encéfalo obedece a una acción de los glucocorticoides, que no es reproducida por la dexametasona, pero asimismo a una acción propia del ruido, tal y como comentamos en su momento. Por su parte, la aplasia de este órgano resulta ser un efecto exclusivamente relacionado con la actividad glucocorticoide de la corticosterona y que la dexametasona podría reproducir en menor nivel a través del mismo tipo de receptor (tipo I).

Este efecto sobre el crecimiento a nivel de los tejidos se evidencia también en un cráneo notablemente más "corto" que el de los animales tratados con ACTH, a lo que contribuye no sólo la menor longitud del neurocráneo sino, esencialmente, la reducción del crecimiento del resto del esplancocráneo que no comprende la arcada cigomática. La exclusión de la región cigomática obedece a que, si bien se muestra muy sensible al efecto reductor sobre el crecimiento y pudiéramos pensar que siguiera reduciéndose en respuesta a una intensidad elevada como la del tratamiento con dexametasona, sin embargo encontramos que su reducción no es más acentuada que en los animales tratados con ACTH. Podemos decir en consecuencia que la región cigomática, a pesar de mostrar una gran capacidad de cambio, "agota" esa capacidad a intensidades moderadas de tratamiento. Esta afirmación también es válida para la longitud del neurocráneo y la anchura craneal, aunque en este último caso hay un matiz diferencial pues recordemos que la anchura del cráneo era además la dimensión menos

sensible a reducir su crecimiento, por lo que su amplitud de cambio resulta más restringida que para la región cigomática y la longitud del neurocráneo.

Por consiguiente, todos estos datos nos indican que hay que tener cuidado a la hora de caracterizar la contribución del esplanocráneo a la reducción del crecimiento craneal de los animales. De manera que sólo cuando el esplanocráneo se considera en su totalidad (es decir, incluyendo la arcada cigomática) se muestra como la región con un mayor margen de cambio pues no sólo presenta una reducción de su crecimiento a intensidades de acción glucocorticoide bajas y moderadas (a resultados de la región cigomática) sino que, como hemos observado en estos animales tratados con dexametasona, su capacidad de respuesta persiste cuando esa intensidad aumenta (a resultados del resto del esplanocráneo). Señal de esta amplitud de su respuesta es que el pequeño incremento de intensidad glucocorticoide que supone el tratamiento conjunto (DxStr) frente a la administración única de dexametasona consigue cráneos aún más cortos por reducción nuevamente de la zona no cigomática del esplanocráneo.

Este efecto reductor sobre el cráneo se manifiesta además en una disminución del peso craneal, y por consiguiente en una pérdida de masa ósea, más acentuada que en los tratamientos anteriores, a la que lógicamente contribuirá la marcada reducción del crecimiento del cráneo. Nuevamente dicha pérdida de hueso no se acompaña de una desmineralización ósea, lo cual plantea como en ocasiones anteriores un efecto inhibitor del crecimiento o división de las células del hueso.

La superior mineralización que observamos en los animales tratados con dexametasona recae en un aumento del contenido de estroncio y de bario, que como ya hemos apuntado no difiere del que presentan los animales estresados o tratados con ACTH. No se observa ningún efecto sobre los niveles de magnesio de modo que, como ya adelantamos, la dexametasona no reproduce el efecto de la corticosterona o de la ACTH disminuyendo los niveles de magnesio. Lamentablemente no disponemos en este caso de bibliografía que nos permita justificar esa diferencia, como sí sucedía en relación con la presencia en el encéfalo de diferentes tipos de receptores de glucocorticoides.

El tratamiento conjunto de administración de dexametasona y exposición al ruido reduce la concentración sanguínea de corticosterona, sin alcanzar valores

tan bajos como en el tratamiento único con el glucocorticoide sintético. La causa de dicho resultado es la acción estimulante del eje HHA ejercida por el estrés. La discusión de los efectos encontrados en los animales expuestos a este tratamiento se ha ido incorporando en los grupos anteriores, a excepción de un aumento significativo del contenido óseo de calcio que sólo se observa en estos animales.

Encontrar dicho aumento en estos animales permite descartar, por una parte, un efecto propio del ruido y, por otra, la implicación del nivel de activación del eje HHA que muestran los animales estresados o tratados con ACTH. Pero también la acción glucocorticoide de la dexametasona por sí sola y, por consiguiente, nos conduce a pensar que debe obedecer a la adición de algún otro factor contenido en el estrés. Evidentemente ese factor añadido es el mayor nivel de corticosterona circulante que une su efecto glucocorticoide al de la dexametasona, superando el umbral necesario para evidenciar respuesta. Por otra parte, la presencia de este efecto únicamente en estos animales impide que podamos conocer cuál es la intensidad de acción glucocorticoide que consigue que el aumento del contenido de calcio alcance su techo de depósito en hueso ya que, para ello, los animales deberían exponerse a una intensidad glucocorticoide superior a la representada por este tratamiento.

Esta circunstancia restringe el empleo del contenido óseo de calcio como marcador inespecífico de estrés ambiental, ya que se requeriría una intensidad tal de acción glucocorticoide que sólo se asociaría a situaciones que lógicamente no son habituales para los organismos.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Como consecuencia de la discusión anterior, queremos destacar una serie de conclusiones que responden a su vez a los objetivos planteados:

- Respecto a los **Objetivos 1a y 1b**, hemos encontrado que en situaciones de exposición a un estrés ambiental de intensidad moderada se producen alteraciones del crecimiento a nivel de órganos, esqueleto y contenido mineral del hueso que, siendo mediadas por la actividad glucocorticoide, pueden quedar enmascaradas por los parámetros o aspectos globales del animal. Tales alteraciones sí se manifiestan más claramente cuando dichas situaciones muestran una intensidad media como la representada por nuestra administración de ACTH. Las poblaciones biológicas humanas o animales pueden estar fácilmente expuestas en su vida cotidiana a tales niveles, moderado y de mediana intensidad, de los agentes estresantes.

- Respecto a los **Objetivos 2a y 2b**, nuestros resultados muestran que el encéfalo es, de los órganos evaluados, el que presenta un crecimiento menos estabilizado a la edad de los animales empleados. La reducción de su crecimiento podría estar relacionada con una aceleración de la pérdida natural de población neuronal accesorio, implicada probablemente en el establecimiento de conexiones que no son funcionales en el animal porque no han sido requeridas durante los procesos de aprendizaje del individuo. La edad de estos animales nos permite descartar un envejecimiento prematuro a costa de la pérdida de neuronas no accesorias que, por lo demás, implicaría una alteración neurológica grave fácilmente detectable durante el contacto diario con los animales. Nosotros no observamos en ese sentido disfunciones comportamentales o motoras, sin embargo resultaría interesante exponer estos animales a estudios que realmente lo confirmen (sobre todo en lo referente a su capacidad posterior de aprendizaje) y, asimismo, considerar la posible implicación que tendría en individuos de mayor edad relacionar el envejecimiento con el ruido ambiental.

Respecto a los **Objetivos 3a, 3b y 3c**, podemos concluir varios aspectos:

1º Que el patrón de crecimiento craneal a la edad y sexo de nuestros animales se caracteriza por presentar gran variabilidad en longitud y una pequeña capacidad de crecimiento en anchura y altura, lo que indica que el crecimiento en estas dos dimensiones se halla prácticamente estabilizado. Esta estabilidad podría ser menos acentuada en altura que en anchura de acuerdo con los resultados del análisis discriminante.

2º Que respecto a un patrón de crecimiento por zonas, el conjunto del esplacnocráneo es el componente craneal más plástico y modificable, mientras que el neurocráneo se muestra más estable. Del esplacnocráneo podemos destacar la arcada cigomática como la más vulnerable a intensidades de actividad glucocorticoide moderada a media. El resto del esplacnocráneo (zona palato-nasal, etc.) sigue respondiendo a los efectos reductores de alta intensidad cuando otras zonas o dimensiones han agotado su capacidad de respuesta.

3º Que consecuentemente con lo dicho en los dos apartados anteriores, el crecimiento craneal en este período de vida del animal (púber) es heterogéneo, y responde de distinta forma a la actividad glucocorticoide mediadora de las respuestas al estrés, posibilitando una pérdida de la proporcionalidad entre las diferentes dimensiones o zonas evaluadas. Este cambio de la morfología o de las proporciones se produce con más relevancia en las situaciones moderadas a medias por ser en ellas cuando los efectos se extienden a unas variables y no a otras. En la medida en que la situación ambiental representa una actividad glucocorticoide mayor, los efectos se generalizan y se tiende a paliar la situación manteniendo la proporcionalidad entre dimensiones y zonas craneales.

4º Que los efectos reductores de las hormonas que median las respuestas a estrés ambiental inespecífico provocan cráneos en general más cortos, con mayor acentuación de este efecto en la zona rostral y con arcadas cigomáticas menos pronunciadas o resaltadas.

Respecto al **Objetivo 3d**, también se plantean varias conclusiones:

1º Que pueden darse efectos mediados por los glucocorticoides de pérdida de masa ósea y reducción del crecimiento del esqueleto por alteración de la reposición celular

adecuada, coincidentes sin embargo con una mineralización (a bajas intensidades) y con una mineralización que incluye calcificación a altas intensidades.

2° Que los marcadores inespecíficos de estrés ambiental en el hueso a intensidades moderadas y medias (niveles cotidianos) son el magnesio, estroncio y bario, y a grandes intensidades (niveles "catastróficos") el calcio.

3° Que de forma especial el estrés por ruido es capaz de provocar efectos propios que ya han sido enumerados. De ellos no se encuentra una adecuada explicación fisiológica al efecto que posee aumentando el contenido óseo de cinc y disminuyendo el de magnesio, aunque sí se pone de manifiesto que no hay mediación por la activación del eje HHA.

Asimismo queremos señalar varios aspectos o aportaciones interesantes de esta Tesis desde el punto de vista metodológico:

1° Que la dexametasona no siempre reproduce los efectos de los glucocorticoides endógenos, hecho en el que interviene la presencia, afinidad e implicación de diferentes receptores.

2° Que es necesario evaluar parámetros como el número y el tamaño celular, a través de la determinación del contenido de ADN y proteínas, para analizar con eficacia efectos de crecimiento sobre órganos, pudiendo ser insuficientes parámetros como el peso.

3° Que la utilización de índices resulta a veces muy indicativa para realzar efectos que pasan desapercibidos.

4° Que las técnicas estadísticas de ACP y análisis discriminante han resultado de gran utilidad no sólo por señalar y corroborar cuáles son las características del patrón de crecimiento craneal de nuestros animales, sino por facilitar la metodología de futuros trabajos de esta naturaleza. Esta simplificación del estudio se debe a que centra nuestra atención sólo en determinadas variables craneométricas, que son las significativas a la hora de diferenciar los grupos de animales entre sí atendiendo a los efectos reductores de los tratamientos sobre el crecimiento craneal. Así, el ACP reúne las variables de partida en un menor número de factores

de modo que representan a esas variables con una pérdida mínima de información, y el discriminante selecciona 13 de las 21 variables originales por ser las que más contribuyen a discriminar entre los grupos de tratamiento. El análisis discriminante nos brinda además la posibilidad de confirmar efectos reductores sobre el crecimiento craneal en animales de iguales características que los nuestros y, en caso afirmativo, conocer a qué intensidad de nuestros tratamientos es comparable dicho efecto.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- ADELL A., GARCIA-MARQUEZ C., ARMARIO A. y GELPI E. Effects of chronic stress on serotonin and noradrenaline in the rat brain. *Biogenic Amines* 7: 19-26, 1990.
- ALARIO P. *Aspectos endocrinos de la hipertensión generada por la exposición crónica a estrés sonoro*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1991.
- ALARIO P., GAMALLO A., BEATO M.J. y TRANCHO G. Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol. Behav.* 40: 29-32, 1987b.
- ALARIO P., GAMALLO A., VILLANUA M.A. y TRANCHO G. Chronic noise stress and dexamethasone administration on blood pressure elevation in the rat. *J. steroid Biochem.* 28: 433-436, 1987a.
- ALARIO P.M., VILLANUA M.A., BEATO M.J. y GAMALLO A. Effect of noise stress and glucocorticoid administration in blood pressure. *J. steroid Biochem.* 25: 109S, 1986.
- ALCOCK J. *Comportamiento animal*. Ed. Salvat. Barcelona, 1978.
- ALTURA B.M., ALTURA B.T., GEBREWOLD A., ISING H. y GÜNTHER T. Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes *in situ*. *Science* 223: 1315-1317, 1984.
- ANDERSON D.L., THOMPSON G.W. y POPOVICH F. Relation between weight, socioeconomics and maturity: dental, skeletal, statural, sexual. *J. Dent. Res. Special Issue A* 54: 53 (Abstract), 1975.

- ANTONI F.A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Rev.* 7: 351-378, 1986.
- ARIZNAVARRETA C., CALDERON M.D., TRESGUERRES J.A.F. y LOPEZ-CALDERON A. Effect of adrenalectomy and propranolol treatment on the response of gonadotrophins to chronic stress in male rats. *Journal of Endocrinology* 120: 275-279, 1989.
- ARMARIO A. y CASTELLANOS J.M. Effect of acute and chronic stress on testosterone secretion in male rats. *J. Endocrinol. Invest.* 7: 659-661, 1984.
- ARMARIO A., CASTELLANOS J.M. y BALASCH J. Chronic and acute stress interrelationship: corticosterone response. *Horm. Metab. Res.* 13: 413-414, 1981.
- ARMARIO A., CASTELLANOS J.M. y BALASCH J. Dissociation between corticosterone and growth hormone adaptation to chronic stress in the rat. *Horm. Metab. Res.* 16: 142-145, 1984a.
- ARMARIO A., LOPEZ-CALDERON A., JOLIN T. y BALASCH J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci. Behav. Rev.* 10: 245-250, 1986.
- ARMARIO A., ORTIZ R. y BALASCH J. Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiol. Behav.* 32: 35-39, 1984b.
- AVANZINO G.L., ERMIRIO R., COGO C.E., RUGGERI P. y MOLINARI C. Effects of corticosterone on neurons of the locus coeruleus in the rat. *Neurosci. Lett.* 80: 85-88, 1987.
- AVIOLI L.V. Glucocorticoid effects on statural growth. *British Journal of Rheumatology* 32 (Suppl. 2): 27-30, 1993.
- BAILIT H.L. Dental variation among populations, an anthropologic view. *Dent. Clin. Nor.*

Amer. 19: 125-139, 1975.

BAILIT H.L., WORKMAN P.L., NISWANDER J.D. y MACLEAN C.J. Dental asymmetry as an indicator of genetic and environmental conditions in human populations. *Hum. Biol.* 42: 626-638, 1970.

BARBANEL G., IXART G., MALAVAL F., MAS N., DIDIER M. y ASSENMACHER I. Activation adrénérgique de la libération de la corticolibérine (CRH41) dans l'éminence médiane du rat non anesthésié. *C. R. Acad. Sci. Paris* 305: 703-708, 1987.

BARDEN H.S. Fluctuating dental asymmetry: a measure of developmental instability in Down syndrome. *Am. J. Phys. Anthropol.* 52: 169-173, 1980.

BARGIEL Z., NOWICKA H. y WOJCIKOWSKA J. Swim-stress induced changes of rat adrenal catecholamine level depending on metabolic state and different ambient temperature. *Folia Histochemica et Cytochemica* 19: 31-38, 1981.

BARON R. y SAFFAR J.L. A quantitative study of the effects of prolonged calcitonin treatment on alveolar bone remodelling in the golden hamster. *Calcif. Tissue Res.* 22: 265-74, 1977.

BARTOLOME M. *Uso clínico de los corticosteroides*. Ed. Ancora. Barcelona, 1989.

BATES P.C. y HOLDER A.T. The anabolic actions of growth hormone and thyroxine on protein metabolism in Snell dwarf and normal mice. *J. Endocr.* 119: 31-41, 1988.

BATEMAN A., SINGH A., KRAL T. y SOLOMON S. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.* 10: 92-112, 1989.

BAXTER J.D. y TYRRELL J.B. Regulation of glucocorticoid production. En: *Endocrinology and Metabolism*. pp. 522-531. Nueva York, 1987.

BAYENDOR D.A. y MARTIN D.L. Sexual dimorphism, stature, and robusticity in the prehistoric Anasazi. *Am. J. Phys. Anthropol.* 78: 189, 1989.

- BAYERS J.H. y MACMILLAN D.E. Effect of prolonged bed rest on bone mineral. *Metabolism* 19: 1071-1084, 1970.
- BEAULIEU S., di PAOLO T., COTE J. y BARDEN N. Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology* 45: 37-46, 1987.
- BELLABARBA D., BEAUDRY C. y LEHOUX J.-G. Corticosteroid receptor in the kidney of chick embryo. II. Ontogeny of corticosterone receptor and cellular development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 305-312, 1983.
- BEYER P.E. y CHERNOFF N. The induction of supernumerary ribs in rodents: role of the maternal stress. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 6: 419-429, 1986.
- BIKLE D.D., HALLORAN B., FONG L., STEINBACH L. y SHELLITO J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 456-461, 1993.
- BINDERMAN I., ZOR U., KAYE A.M., SHIMSHONI Z., HARELL A. y SOMJEN D. The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A. *Calcif. Tissue Int.* 42: 261-266, 1988.
- BISQUERRA R. *Introducción conceptual al análisis multivariable. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL y SPAD. Vol I.* PPU, S.A., Barcelona, 1989.
- BOUMPAS D.T., PALIOGIANNI F., ANASTASASSIOU E.D. y BALOW J.E. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clinical and Experimental Rheumatology* 9: 413-423, 1991.
- BRANDT M. y SIEGEL M.I. The effects of stress on cortical bone thickness in rodents. *Am. J. Phys. Anthropol.* 49:31-34, 1978.

- BRESIN A., JOHANSSON C.B. y KILIARIDIS S. Effects of occlusal strain on the development of the dentoalveolar process in the growing rat. A morphometric study. *Eur. J. Exp. Musculoskel. Res.* 3: 112-122, 1994.
- BRESSOT C., MEUNIER P.J., CHAPUY M.C., LEJEUNE E., EDOUARD C. y DARBY A.J. Histomorphometric profile, pathophysiology and reversibility of corticosteroid-induced osteoporosis. *Metab. Bone Dis. Rel.* 1: 303-311, 1979.
- BROWN M.S. y GOLDSTEIN J.L. Receptor, mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 91: 150-154, 1976.
- BROWN A. y HENIGER G. Stress induced growth hormone release. *Psychosom. Med.* 38: 145, 1976.
- BROWN K.I. y NESTOR K.E. Some physiological responses of turkeys selected for high and low adrenal response to cold stress. *Poult. Sci.* 52: 1948-1954, 1973.
- BUIKSTRA J.E., FRANKENBERG S., LAMBERT J.B. y XUE L. Múltiples elementos: múltiples expectativas. En: *The chemistry of prehistoric human bone*. Price T.D. (Ed.). Cambridge Univ. Press, 1989.
- BYRD K.E. Craniofacial sequelae of lesions to facial and trigeminal motor nuclei in growing rats. *Am. J. Phys. Anthropol.* 76: 87-103, 1988.
- CANALIS E., MCCARTHY T.L. y CENTRELLA M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu. Rev. Med.* 42: 17-24, 1991.
- CANNON W.B. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Amer. J. Physiol.* 33: 356, 1914.
- CANNON W.B. Stress and strains of homeostasis. *Amer. J. Med. Sci.* 189: 1, 1935.
- CARPENTER M.B. *Neuroanatomía humana*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, 1985.

- de CASTRO S. *Etiología, Fisiopatología, Semiología, Síndromes*. Salvat Editores, S.A. Barcelona, 1989.
- CEULEMANS D.L.S., WESTENBERG H.G.M. y VAN PRAAG H.M. The effect of stress on the dexamethasone suppression. *Psychiat. Res.* 14: 189-195, 1984.
- CHATTERTON R.T. The role of stress in female reproduction: animal and human considerations. *Int. Fertil.* 35: 8-13, 1990.
- CHESNEY R.W., MAZESS R.B., HAMSTRA A.J. y DELUCA H.F. Reduction of serum-1,25-dihydroxivitamin-D in children receiving glucocorticoids. *Lancet* ii: 1123-1125, 1978.
- CHESNUT C.H. Bone mass and exercise. *Amer. J. Med.* 95: 34S-36S, 1993.
- CLEUVENOT E. y HOUËT F. Proposition de nouvelles équations d'estimation de stature applicables pour un sexe indéterminé, et basées sur les échantillons de Trotter et Gleser. *Bull. et Mém. de la Soc. d'Anthrop. de Paris* 5: 245-255, 1993.
- CORNER B.D. y RICHTSMEIER J.T. Cranial growth in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): a quantitative analysis using three dimensional coordinate data. *Am. J. Phys. Anthropol.* 87: 67-81, 1992.
- CORSON S.A. y CORSON E.O'L. Biopsychogenic stress. *Selye's Guide to Stress Res.* 2: 271-320, 1983.
- DALMAN F.C., SANCHEZ E.R., LIN A.L.-Y., PERINI F. y PRATT W.B. Localization of phosphorylation sites with respect to the functional domains of the mouse L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 12259-12267, 1988.
- DANIELSEN C.C., MOSEKILDE L. y SVENSTRUP B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif. Tissue Int.* 52: 26-33, 1993.

- DARBEIDA H. y DURAND P. Glucocorticoid enhancement of adrenocorticotropin-induced 3',5'-cyclic adenosine monophosphate production by cultured ovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 121: 1051-1055, 1987.
- De MENIS E., Da RIN G., ROITER I., LEGOVINI P., FOSCOLO G. y CONTE N. Bone turnover overt and subclinical hyperthyroidism due to autonomous thyroid adenoma. *Horm. Res.* 37: 217-220, 1992.
- DE WITT M.Y., HANDLEY C.J., OAKES B.W. y LOWTHER D.A. *In vitro* response of chondrocytes to mechanical loading: the effect of short term mechanical tension. *Connect. Tissue Res.* 12: 97-109, 1984.
- DeNICOLA A.F. Efectos moleculares de los glucocorticoides. En: *Endocrinología molecular*. EEd. El Ateneo. Buenos Aires, 1985.
- DEMPSTER D.W. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Bone Min. Res.* 4: 137-141, 1989.
- DEMPSTER D.W., COSMAN F., PARISIEN M., SHEN V. y LINDSAY R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocrine Rev.* 14: 690-709, 1993.
- DiBENNARDO R. y BAILIT H.L. Stress and dental asymmetry in a population of Japanese children. *Am. J. Phys. Anthropol.* 48: 89-94, 1978.
- DIETRICH J.W., CANALIS E.M., MAINA D.M. y RAISZ L.G. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis *in vivo*. *Endocrinology* 104: 715-721, 1979.
- DIMSDALE J.W. y MOSS J. Plasma catecholamine in stress and exercise. *JAMA* 243: 340-342, 1980.
- DiORIO L.P., MILLER S.A. y NAVIA J.M. The separate effects of protein and calorie malnutrition on the development and growth of rat bones and teeth. *J. Nutr.* 103: 856-865, 1973.

- DOBRAKOVOVA M., OPRSA LOVA Z., MIKULAJ L., KVETNANSKY R., MURGAS K. y LICHARDUS B. Hypertension induced by repeated stress: possible participation of sympathetic adrenomedullary catecholamines. *Endocrinologia Experimentalis* 18: 169-176, 1984.
- DUBROVSKY B., WILLIAMS D. y KRAULIS I. Effects of deoxycorticosterone and its ring A-reduced derivatives on the nervous system. *Exp. Neurol.* 78: 728-739, 1982.
- DURIEZ J., FLAUTRE B., BLARY M.C. y HARDOUIN P. Effects of the calcium channel blocker nifedipine on epiphyseal growth plate and bone turnover: a study in rabbit. *Calcif. Tissue Int.* 52: 120-124, 1993.
- EDWARD-WYNNE V.C. Population control in animals. *Sci. Amer.* 211: 68-74, 1964.
- EHRlich M.E., EVINGER M.J., JOH T.H. y TIETELMAN G. Do glucocorticoids induce adrenergic differentiation in adrenal cells of neural crest origin?. *Develop. Brain Res.* 50: 129-137, 1989.
- EKENSTAM E., STALENHEIM G. y HALLGREN R. The acute effect of high dose corticosteroid treatment on serum osteocalcin. *Metabolism* 37: 141-144, 1988.
- ENESCO M. y LEBLOND C.P. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs of the young male rat. *J. Embriol. Exptl. Morphol.* 10: 530-562, 1962.
- FAHMY A., LEE S. y JOHNSON P. Ultrastructural effects of testosterone on epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Res.* 7: 12-22, 1969.
- FARLEY J.R., TARBAUX N., MURPHY L.A., MASUDA T. y BAYLINK. D.J. *In vitro* evidence that bone formation may be coupled to resorption by release of mitogen(s) from resorbing bone. *Metabolism* 36: 314-321, 1987.
- FEIK S.A., STORY E. y ELLENDER G. Stress induced periosteal changes. *Br. J. exp. Path.* 68: 803-813, 1987.
- FELDMAN S., CHOWERS I. y CONFORTI N. Effect of dexamethasone on adrenocortical

response in intact and hypothalamic deafferented rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 73: 660, 1973.

FELDMAN D., FUNDER J.W. y EDELMAN I.S. Evidence for a new class of corticosterone receptors in rat kidney. *Endocrinology* 92: 1429-1441, 1973.

FERNANDEZ-TRESGUERRES J.A. *Fisiología Endocrina*. Ed. Univ. Complutense. Madrid, 1989.

FOSS M.C., KETTELHUT I.C., MOREIRA A.C. y MIGLIORINI R.H. Effect of adrenalectomy on glucose homeostasis in rats fed a high-protein, carbohydrate-free diet. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20: 261-268, 1987.

FUCIK R.F., KUKREJA S.C., HARGIS G.K., BOWSER E.N., HENDERSON W.J. y WILIAMS G.A. Effect of glucocorticoids on function of the parathyroid glands in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 152-155, 1975.

FUNDER J.W., FELDMAN D. y EDELMAN I.S. The role of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology* 92: 994-1004, 1973a.

FUNDER J.W., FELDMAN D. y EDELMAN I.S. Glucocorticoid receptor in rat kidney. The binding of tritiated dexamethasone. *Endocrinology* 92: 1005-1013, 1973b.

GAGNON J., HO-KIM M.-A., BOISSONNEAULT G., DUBE J.Y., ROGERS P.A. y TREMBLAY R.R. The influence of immobilization stress on cardiac protein synthesis. A possible regulatory role for glucocorticoids. *Journal of Receptor Research* 7: 639-652, 1987.

GALLAGHER J.C., AARON J., HORSMAN A., WILKINSON R. y NORDIN B.E.C. Corticosteroid osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2: 355-368, 1973.

GAMALLO A., ALARIO P., GONZALEZ-ABAD M.J. y VILLANUA M.A. Acute noise stress, ACTH administration, and blood pressure alteration. *Physiol. Behav.* 51: 1201-

1205, 1992.

GAMALLO A., ALARIO P., VELASCO J. y TRANCHO G. Plasmatic catecholamines levels in chronic noise and foot-shock stress-induced blood pressure alterations in rat. *J. steroid Biochem.* 36(Suppl.): 48S, 1990.

GAMALLO A., ALARIO P., VILLANUA M.A. y NAVA M.P. Effect of chronic stress on blood pressure in the rat: ACTH administration. *Horm. Metabol. Res.* 20: 336-338, 1988.

GAMALLO A., PUERTA M.L., VILLANUA M.A., ALARIO P. y ABELENDA M. Tejido adiposo pardo de ratas con altos niveles plasmáticos de glucocorticoides. *Endocrinología* 34(Supl. 1): 32, 1987.

GAMALLO A., VILLANUA M.A. y BEATO M.J. Body weight gain and food intake alterations in crowd-reared rats. *Physiol. Behav.* 36: 835-837, 1986a.

GAMALLO A., VILLANUA A., TRANCHO G. y FRAILE A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol. Behav.* 36: 217-221, 1986b.

GARCIA-MARQUEZ C. y ARMARIO A. Interaction between chronic stress and clomipramine treatment in rats. Effects on exploraty activity, behavioral despair, and pituitary-adrenal function. *Phychopharmacology* 93: 77-81, 1987.

GARLAND R.C. Induction of glucose 6-phosphatase in cultured hepatoma cells by dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 1130-1134, 1986.

GARLAND R.C. Effect of insulin on the induction by dexamethasone of glucose-6-phosphohydrolase and translocase activities in cultured hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 307-312, 1988.

GASC J.M. y BAULIEU E.E. Steroid hormone receptors: intracellular distribution. *Biol. Cell.* 56: 1-6, 1986.

- GENOVES S. Proportionality of the long bones and their relation to stature among Mesoamericans. *Am. J. Phys. Anthropol.* 26: 67-78, 1967.
- GEST T.R., SIEGEL M.I. y ANISTRANSKI J. Increased fluctuating asymmetry in the long bones of neonatal rats stressed by cold, heat and noise. *Am. J. Phys. Anthropol.* 60: 1969-1979, 1983.
- GILES E. Modifying stature estimation from the femur and tibia. *J. For. Sciences* 38: 758-763, 1993.
- GILSANZ V., GIBBENS D.T., ROE T.F., CARLSON M., SCHULZ E.E. y CANN C.E. Vertebral bone density in children: effect of puberty. *Radiology* 166: 847-850, 1988.
- GIRALT M., GARCIA-MARQUEZ C. y ARMARIO A. Previous chronic ACTH administration does not protect against the effects of acute or chronic stress in male rats. *Physiol. Behav.* 40: 165-170, 1987.
- GIUSTINA A., GIRELLI A., DOGA M., BODINI C., BOSSONI S., ROMANELLI G. y WEHRENBURG W.B. Pyridostigmine blocks the inhibitory effect of glucocorticoids on growth hormone-releasing hormone stimulated growth hormone secretion in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 1-5, 1990.
- GIUSTINA A., ROMANELLI G., BOSSONI S., GIRELLI A., PIZZACOLO G., VALENTINI U. y ZUCCATO F. Effects of short-term glucocorticoid deprivation on growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in man. *Horm. Metabol. Res.* 21: 693-694, 1989.
- GLOBUS R.K., BIKLE D.D. y MOREY-HOLTON E.R. Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. *Endocrinology* 114: 2264-2269, 1984.
- GLOBUS R.K., BIKLE D.D. y MOREY-HOLTON E.R. The temporal response of bone to unloading. *Endocrinology* 118: 733-742, 1985.
- GLUCKMAN L. y SHKLAR G. The steroid hormones and tissues of the peridontium. A

series of related experiments in white mice. *Oral Surg. oral Med. oral Path.* 8: 1179-1191, 1955.

GOLDSTEIN D.S. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metabol.* 1: 253-278, 1987.

GOOSE D.H. y LEE G.T.R. Inheritance of tooth size in immigrant populations. *J. Dent. Res.* 52: 175, 1973.

GORDON K.R., BURNS P. y KELLER G. Experimental changes in mineral content of juvenile mouse femora. *Calcif. Tissue Int.* 51: 229-232, 1992.

GRAY J.A. *The psychology of fear and stress*. Ed. Weidenfeld and Nicholson. London, 1971.

GRUNT J.A. y SCHWARTZ I.D. Growth, short stature, and the use of growth hormone: considerations for the practicing pediatrician. *Current Problems in Pediatric* 390-412, 1992

GUILLEMIN P. y ROSSENBERG B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 57: 599-607, 1955.

GUILLEMIN R., VANGO J., ROSSIER J., MINICK S., LING N., RIVIER C., VALE W. y BLOOM F. Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science* 197: 1367-1368, 1977.

HAHN T.J. y HALSTEAD L.R. Cortisol enhancement of PTH-stimulated cyclic AMP accumulation in cultured fetal rat long bone rudiments. *Calcif. Tissue Int.* 29: 173-175, 1979.

HAHN T.J., HALSTEAD L.R. y BARAN D.T. Effects of short term glucocorticoid administration on intestinal calcium absorption and circulating vitamin D metabolite concentrations in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 111-115, 1981.

HAHN T.J., HALSTEAD L.R., TEITELBAUM S.L. y HAHN B.H. Altered mineral

metabolism in glucocorticoid-induced osteopenia. Effect of 25-hydroxivitamin D administration. *J. Clin. Invest.* 64: 655-665, 1979.

HALLORAN B.P., BIKLE D.D., CONE C.M. y MOREY-HOLTON E. Glucocorticoids and inhibition of bone formation induced by skeletal unloading. *Am. J. Physiol.* 255 (*Endocrinol. Metab.* 18): E875-E879, 1988.

HANDA M., KONDO K., SUZUKI H. y SARUTA T. Dexamethasone hypertension in rats: role of prostaglandins and pressor sensitivity to norepinephrine. *Hypertension* 6: 236-241, 1984.

HARRELL A., DEKEL S. y BINDERMAN I. Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcif. Tissue Res.* 22 (Suppl): 202-207, 1977.

HARRIS E.F. y NWEIEIA M.T. Dental asymmetry as a measure of environmental stress in the Ticuna Indians of Colombia. *Am. J. Phys. Anthropol.* 53: 133-142, 1980.

HASHIMOTO K., YUNOKI S., KAGEYAMA Y., ONHO N., TAWAHARA J. y OFUJI T. Vasopressin and CRF-ACTH in adrenalectomized and dexamethasone-treated rats. *Neuroendocrinology* 32: 87-91, 1981.

HAUGER R.L., MILLAN M.A., CATT K.J. y AGUILERA G. Differential regulation of brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors by corticosterone. *Endocrinology* 120: 1527-1533, 1987.

HERMUS A., PIETERS G., PESMAN G., SMALS A., BENRAAD T. y KLOPPENBORG P. Responsivity of adrenocorticotropin to corticotropin-releasing hormone and lack of suppressibility by dexamethasone are related phenomena in Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 634-639, 1986.

HERRERA E. Aspectos básicos de las adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación y relaciones materno-fetales. En: *Bioquímica perinatal*. pp. 17-39. Ed. Ceura. Madrid, 1988.

- HINTZE J.L. *Number Cruncher Statistical System*. Versión 5.0. Ed. Hintze. Kaysville, 1987.
- HOWLETT T.A. y RESS L.H. Endogenous opioid peptides and hypothalamo-pituitary function. *Amer. Rev. Physiol.* 48: 1986.
- HSIEH S.T., LYMANGROVER J.R., DUNLAP W.P., MAJEAU-CHARGAIS D., WALKER C.F. y SETO Y.J. High-intensity electric field induced mild stress response in animal organ weights. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 14: 45-56, 1985.
- HUBLE J. Effects of cortisone acetate on chondrogenesis and ossification in cockerels. *Acta Endocrinol.* 25: 59-63, 1957.
- HUGHES-FULFORD M., APPEL R., KUMEGAWA M. y SCHMIDT J. Effect of dexamethasone on proliferating osteoblast: inhibition of prostaglandin E2 synthesis, and alterations in actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research* 203: 150-156, 1992.
- IDLER D.R. Some comparative aspects of corticosteroid metabolism. En: *Hormonal steroids*. James and Martini (Eds.). Amsterdam, 1971.
- IKEDA T., KOHNO H., YAMAMURO T., KASAI R., OHTA S., OKUMURA H., KONISHI J., KIKUCHI H. y SHIGENO C. The effect of active vitamin D3 analogs and dexamethasone on the expression of osteocalcin gene in rat tibiae *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1231-1235, 1992.
- IZUMI T. y FUKUYAMA Y. Influence of ACTH on serum hormone content and its anticonvulsant action towards infantile spasms. *Life Sci.* 34: 1023-1028, 1984.
- IZUMI T., IMAIZUMI CH., ASHIDA E., OCHIAI T., WANG P.-J. y FUKUYAMA Y. Suppressive action of ACTH on growth hormone secretion in patients with infantile spasms. *Brain Dev.* 7: 636-639, 1985.
- JARA-ALBARRAN A. *Ayer y hoy de la enfermedad de Addison*. Ed. Panamericana. Madrid, 1988.

- JEE W.S.S., WRONSKI T.J., MOREY E.R. y KIMMEL D.B. Effects of spaceflight on trabecular bone in rats. *Am. J. Physiol.* 244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 13): R310-R316, 1983.
- JURCOVICOVA J., DOBRAKOVOVA M., JEZOVA D., OPRSALOVA Z., KVETNANSKY R. y VIGAS M. Different pattern of prolactin release under various acute stress stimuli in rats. *Endocrinologia Experimentalis* 22: 235-242, 1988.
- JURCOVICOVA J., VIGAS M., KLIR P. y JEZOVA D. Response of prolactin, growth hormone and corticosterone secretion to morphine administration or stress exposure in wistar-AVN and Long Evans rats. *Endocrinologia Experimentalis* 239: 209-214, 1984.
- KALIN N.H. y SHELTON S.E. Acute behavioral stress affects the dexamethasone suppression test in Rhesus monkeys. *Biol. Psychiatry* 19: 113-117, 1984.
- KANEKO M., HIROSHIGE T., SHINSAKO J. y DALLMAN N. Diurnal changes in amplification of hormone rhythm in the adrenocortical system. *Am. J. Physiol.* 239: 309-316, 1980.
- KANT G.J., LENOX R.H., BUNNEL B.N., MOUGEY E.H., PENNINGTON L.L. y MEYERHOFF J.L. Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 8: 421-428, 1983.
- KELLER S.E., WEISS J.M., MILLER N.E. y STEIN M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science* 221: 1301, 1983.
- KELLER-WOOD M.E. Control of canine ACTH by corticosteroids: an integral feed-back effect of steroids. *Am. J. Physiol.* 257 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 3): R427-R430, 1989.
- KELLER-WOOD M.E. y DALLMAN M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5: 1-24, 1984.

- KELLY F.J., McGRATH J.A., GOLDSPINK D.F. y CULLEN M.J. A morphological/biochemical study on the actions of corticosteroids on rat skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 9:1-10, 1986.
- KIESER J.A., GROENEVELD H.T. y PRESTON C.B. Fluctuating dental asymmetry as a measure of odontogenic canalization in man. *Am. J. Anthropol.* 71: 437-444, 1986.
- KILIARIDIS S. Muscle function as a determinant of mandibular growth in normal and hypocalcaemic rat. *European Journal of Orthodontics* 11: 298-308, 1989.
- KILIARIDIS S., ENGSTRÖM C. y CHAVEZ L.M.E. Influence of masticatory muscle function on craniofacial growth in hypocalcemic rats. *Scand. J. Dent. Res.* 100: 330-336, 1992.
- KIRN B.N. y FIRMAN J.D. Leg strength and performance of large white tom turkeys fed various protein and energy levels. *Avian Diseases* 37: 37-46, 1993.
- KLEIN R.G., ARNAUD S.B., GALLAGHER J.C., DELUCA H.F. y RIGGS B.L. Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisolism. *J. Clin. Invest.* 60: 253-259, 1977.
- de KLOET E.R., WALLACH G. y McEWEN B.S. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96: 598-609, 1975.
- KLOSTERMAN L.L., MURAI J.T. y SIITERI P.K. Cortisol levels, binding and properties of corticosteroid-binding globulin in the serum of primates. *Endocrinology* 118: 424-434, 1986.
- KOTANIEMI A., SAVOLAINEN A., KAUTIAINEN H. y KRÖGER H. Estimation of central osteopenia in children with chronic polyarthritis treated with glucocorticoids. *Pediatrics* 91: 1127-1130, 1993.
- KOWALEWSKI K. Uptake of radiosulfur in growing bones of cockerels treated with cortisone and 17-ethyl-19 nortesterone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97: 432-434, 1958a.

- KOWALEWSKI K. Uptake of radiosulfate in growing bones of cockerels treated with cortisone and certain anabolic-androgenic steroids. *Endocrinology* 63: 759-764, 1958b.
- KRÖGER H., KOTANIEMI A., VAINO P. y ALHAVA E. Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy x-ray absorptiometry. *Bone Miner.* 17: 75-85, 1992.
- KUFFLER S.W. y NICHOLLS J.G. Especificidad de las conexiones neuronales. En: *De la neurona al cerebro*. pp. 383-406. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, 1982.
- KUROSHIMA A., HABARA Y., UEHARA A., MURAZUMI K., YAHATA T. y OHNO T. Cross adaptation between stress and cold in rats. *Pflügers Arch.* 402: 402-408, 1984.
- LAAN R.F., VAN RIEL P.L., VAN DE PUTTE L.B., VAN ERNING L.J., VAN'T HOF M.A. y LEMMENS J.A. Low-dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Intern Med.* 119: 963-968, 1993.
- LaBORDE J.B., HANSEN D.K., YOUNG J.F., SHEEHAN D.M. y HOLSON R.R. Prenatal dexamethasone exposure in rats: effects of dose, age at exposure, and drug-induced hypophagia on malformations and fetal organ weights. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19: 545-554, 1992.
- LAIN P. *Historia de la Medicina*. Salvat Editores, S.A. 1978.
- LANUM J., CAMPBELL M.E., BLICK D.W., KNOX J. y WHEELER T.G. Effects of restraint on open-field activity, shock avoidance learning, and gastric lesions in the rat. *Animal Learning & Behavior* 12: 195-201, 1984.
- LARSEN T. Dephytinization of a rat diet. Consequences for mineral and trace element absorption. *Biol. Tr. Elem. Res.* 39: 55-71, 1993.
- LARSEN T. y SANDSTRÖM B. Effect of calcium, copper, and zinc levels in a rapeseed meal diet on mineral and trace element utilization in the rat. *Biol. Tr. Elem. Res.* 35:

167-184, 1992a.

LARSEN T. y SANDSTRÖM B. Tissues and organs as indicators of intestinal absorption of minerals and trace elements, evaluated in rats. *Biol. Tr. Elem. Res.* 35: 185-199, 1992b.

LAUDENSLAGER M.L., RYAN S.M., DRUGAN R.C., HYSON R.L. y MAIER S.F. Coping and immunosuppression: inescapable but no escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science* 221: 568, 1983.

LAWSON P.T., LOVAGLIO J., LIU C. y LIPKIN E.W. A histomorphometric comparison of bone in young growing rats fed an elemental diet versus a chemically defined polymeric diet. *Journal of the American College of Nutrition* 12: 53-60, 1993.

LEAMY L.J. y BADER R.S. Components of variance of odontometric traits in a wild-derived population of *Peromyscus leucopus*. *Evolution* 22: 826-834, 1968.

LEBLONDEL G. y ALLAIN P. Effects of adrenalectomy and of adrenal hormones on the tissue distribution of 14 elements in the rat. *Biol. Tr. Elem. Res.* 16: 27-42, 1988a.

LEBLONDEL G. y ALLAIN P. Altered element concentrations in tissues of spontaneously hypertensive rats. *Biomed. & Pharmacother.* 42:121-129, 1988b.

LEECH J.A., HODDER R.V., OOI D.S. y GAY J. Effects of short-term inhaled Budesonide and Beclomethasone Dipropionate on serum osteocalcin in premenopausal women. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 113-115, 1993.

LEMOINE A.P., ARMANDO I., BRUN J.C., SEGURA E.T. y BARONTINI M. Footshock affects heart and brain MAO inhibitory activity and open field behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35: 1-4, 1990.

LEVI L. Stress distress and psychosocial stimuli. *Occup. Mental Health.* 3: 2-10, 1973.

LEVI-MONTALCINI R. y CALISSANO P. El factor de crecimiento nervioso. *Investigación y Ciencia* 35: 18-28, 1979.

- LOPEZ-CALDERON A. Glándulas suprarrenales. En: Tresguerres J.A.F. *Fisiología Humana*. pp. 971-991. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, 1992.
- LOPEZ-CALDERON A., ARIZNAVARRETA C., CALDERON M.D. y TRESGUERRES J.A. Gonadotropin inhibition during chronic stress: role of the adrenal gland. *J. steroid Biochem.* 27: 609-614, 1987.
- LOPEZ-CALDERON A., ARIZNAVARRETA C., CALDERON M.D., TRESGUERRES J.A. y GONZALEZ-QUIJANO M.I. Role of the adrenal cortex in chronic stress-induced inhibition of prolactin secretion in male rats. *J. Endocrinol.* 120: 269-273, 1989.
- LOPEZ-CALDERON A., ESQUIFINO A. y TRESGUERRES J.A. Influencia de la ACTH y glucocorticoides sobre los niveles plasmáticos de prolactina en la rata macho. *Rev. Española de Fisiología* 40: 483-488, 1984.
- LÖWIK C.W.G.M., VAN LEEUWEN J.P.T.M., VAN DER MEER J.M., VAN ZEELAND J.K., SCHEVEN B.A.A. y HERRMANN-ERLEE M.P.M. A two-receptor model for the action of parathyroid hormone on osteoblasts: a role for intracellular free calcium and cAMP. *Cell Calcium* 6: 311-326, 1985.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- LUKERT B.P. y RAISZ L.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann. Intern. Med.* 112: 352- 364, 1990.
- LUNDBERG U. y FRANKENHAUSER M. Psychophysiological reactions to noise as modified by personal control over noise intensity. *Biol. Psychol.* 6:51-59, 1978.
- MARTIN O. *Determinación elemental de componentes mayoritarios, minoritarios y traza en tejido óseo por espectrometría de emisión por plasma de acoplamiento inductivo*. Memoria de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid, 1993.

- MARTIN D.L., GOODMAN A.M., ARMELAGOS G.J. y MAGENNIS A.L.
Reconstructing life from patterns of death and disease. En: *Black Mesa Anasazi health*. Kissell R.N. (Ed.). pp. 11-15. Occasional paper No 14. Southern Illinois University at Carbondale Center for archaeological investigations, 1991.
- MARVER D. Evidence of corticosteroid action along the nephron. *Am. J. Physiol.* 246 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 15): F111-F123, 1984.
- MASON J.W. Review of the psychoendocrinological research in the pituitary adrenocortical system. *Psychom. Med.* 30: 576, 1968.
- MASON J.W. Emotion as reflected in patterns of endocrine integration. En: Levi L. *Emotions: Their Parameters and Measurement*. pp. 143-181. N.Y. Raven, 1975a.
- MASON J.W. A historical view of the stress field. *J. Human Stress* 1: 6-12 y 1: 22-36, 1975b.
- MAZESS R.B. y CAMERON J.R. Skeletal growth in school children: maturation and bone mass. *Am. J. Phys. Anthropol.* 35: 399-407, 1971.
- MAZZOCCHI G., MALENDOWICK L.K., CAVALLI L., MENESGHELLI V. y NUSSDORFER G.G. Effect of streptozotocin-induced experimental diabetes on the steroidogenic capacity of rat adrenal zona fasciculata. *Biomed. Res.* 9: 239-242, 1988a.
- MAZZOCCHI G., MALENDOWICK L.K., GOTTARDO G. y NUSSDORFER G.G.
Evidence that prolonged α -MSH infusion enhances the steroidogenic capacity of the rat adrenal glomerulosa *in vivo*. *J. steroid Biochem.* 29: 441-442, 1988b.
- McCARRON D.A. Calcium metabolism and hypertension. *Kidney Int.* 35: 717-736, 1989.
- McEWEN B.S., WEISS J.M. y SCHWARTZ L.S. Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain Res.* 16: 227-241, 1969.

- MEDEIROS D.M. Hypertension in the Wistar-Kyoto rat as a result of post-weaning copper restriction. *Nutr. Res.* 7: 231-235, 1987.
- MEYER J.S. Prevention of adrenalectomy-induced brain growth stimulation by corticosterone treatment. *Physiol. Behav.* 41: 391-395, 1987.
- MILTON J.S. y TSOKOS J.O. *Estadística para biólogos y ciencias de la salud*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, 1987.
- MIZUNO T., OKADA M., ITOH A., MARUYAMA T., HAGIWARA H. y HIROSE S. Affinity labeling of ACTH receptors in bovine adrenal cortex membranes. *Biochem. Internat.* 19: 695-700, 1989.
- MOONEY M.P., SIEGEL M.I. y GEST T.R. Prenatal stress and increased fluctuating asymmetry in the parietal bones of neonatal rats. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68: 131-134, 1985.
- MORMEDE P., DANTZER R., MONTPIED P., BLUTHE R., LAPLANTE E. y LEMOAL M. Influence of shock-induced fighting and social factors on pituitary-adrenal activity, prolactin and catecholamines synthesizing enzymes in rats. *Physiol. Behav.* 32: 723-729, 1984.
- MORRISON N.A., SHINE J., FRAGONAS J.C., VERKEST V., MCMENEMY M.L. y EISMAN J.A. 1-25-dihydroxivitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science* 246: 1158-1161, 1989.
- MOSEKILDE L., DANIELSEN D.D. y KNUDSEN U.B. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone* 14: 1-6, 1993.
- MUELLER M., SCHILLING T., MINNE H.W. y ZIEGLER R. A systemic acceleratory phenomenon (SAP) accompanies the regional acceleratory phenomenon (RAP) during healing of a bone defect in the rat. *J. Bone Miner. Res.* 6: 401-410, 1991.

- MUELLER M., SCHILLING T., MINNE H.W. y ZIEGLER R. Does immobilization influence the systemic acceleratory phenomenon that accompanies local bone repair? *J. Bone Miner. Res.* 7(Suppl. 2): S425-S427, 1992.
- MUIR J.L. y PFISTER H.P. Time course of the corticosterone and prolactin response following predictable and unpredictable novelty stress in *Rattus norvegicus*. *Physiol. Behav.* 40: 103-107, 1987.
- MUNCK A., GUYRE P.M. y HOLBROOK N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinology* 5: 25-29, 1985.
- NADAL J., VERICAD J.R., VIDAL A., MARTINEZ-RICA J.P. y BALCELLS E. *Guión para trabajos prácticos. Zoología-Cordados*. Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental. 1968.
- NAKAGAWA K., AKIKAWA K., MATSUBARA M., KUBO M., ISHIZUKA T. y OBARA T. Biphasic effects of dexamethasone on growth hormone release *in vitro*. *Endocrinol. Japon* 34: 947-953, 1987a.
- NAKAGAWA K., ISHIZUKA T., OBARA T., MATSUBARA M. y AKIKAWA K. Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 116: 165-171, 1987b.
- NAVARRO H.A., KUDLACZ E.M., EYLER J.P. y SLOTKIN T.A. Prenatal dexamethasone administration disrupts the pattern of cellular development in rat lung. *Teratology* 40: 433-438, 1989.
- NAVARRO H.A., LACHOWICZ J., BARTOLOME J., WHITMORE W.L. y SLOTKIN T.A. Effects of prenatal dexamethasone on development of ornithine decarboxylase activity in brain and peripheral tissues of rats. *Pediatr. Res.* 24: 465-469, 1988.
- NGAN P.W., CROCK B., VARGHESE J., LANESE R., SHANFELD J. y DAVIDOVITCH Z. Immunohistochemical assessment of the chemical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 33: 163-

174, 1988.

NIEWOEHNER C.B. Is it more common that we think?. En: *Osteoporosis in men. Postgraduate Medicine*. Ed. McGraw-Hill, Inc. 1993.

NISWANDER J.D. y CHUNG C.S. The effects of inbreeding on tooth size in Japanese children. *Am. J. Hum. Genet.* 17: 390-398, 1965.

NOBLE W. y DELINI-STULA A. Effect of oxprenolol on some fear-induced behavioral responses and hyperthermia in rats subjected to inescapable shocks. *Psychopharmacology* 49: 17-22, 1976.

NORMAN A.W., ROTH J. y ORCI L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism hormone receptors, and biological response. *Endocrinol. Rev.* 3: 331-366, 1982.

NORUSIS M. *SPSS Pc+. Advanced statistics V2.0*. SPSS Inc. Chicago, USA.

NUTI R. y MARTINI G. Effects of age and menopause of bone density of entire skeleton in healthy and osteoporotic women. *Osteoporosis Int.* 3: 59-65, 1993.

OLBRICHT T. y BENKER G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, prevention and treatment, with special regard to the rheumatic diseases. *J. Intern. Med.* 234: 237-244, 1993.

ORWOLL E.S. The effects of dietary protein insufficiency and excess on skeletal health. *Bone* 13: 343-350, 1992.

OXENKRUG G.F., McINTYRE I.M. y GERSHON S. Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosterone circadian rhythm in rats. *J. Pineal Res.* 1: 181-185, 1984a.

OXENKRUG G.F., McINTYRE I.M., STANLEY M. y GERSHON S. Dexamethasone suppression test: experimental model in rats, and effect of age. *Biol. Psychiat.* 19: 413-416, 1984b.

- OYHENART E.E. y PUCCIARELLI H.M. Sexual cranial dimorphism in malnourished rats treated with growth hormone. *Growth, Development & Aging* 56: 179-184, 1992.
- PARFITT A.M. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. En: *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*. Recker R. (Ed.). pp. 143-217. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1983.
- PARROT-GARCIA M. y McCARRON D.A. Calcium and hypertension. *Nutrition reviews* 42: 205-213, 1984.
- PAYNTER K.J. y GRAINGER R.M. The relation of nutrition to the morphology and size of rat molar teeth. *J. Canad. Dent. Assoc.* 22: 519-531, 1956.
- PERNOT F., LUTHRINGER C., VINCENT M., SASSARD J., BERTHELOT A. y GAIRARD A. Calcium metabolism in the Lyon hypertensive rat. *Ann. Nutr. Metab.* 35: 45-52, 1991.
- PERZIGIAN A.J. Fluctuating dental asymmetry: Variation among skeletal populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 47: 81-88, 1977.
- PITMAN D.L., OTTENWELLER J.E. y NATELSON B.H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restrain stress: chronic stress and habituation. *Physiol. Behav.* 43: 47-55, 1988.
- PLOTSKY P.M. y VALE W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* 114: 164, 1984.
- POLLARD A.W., FEIK S.A. y STOREY E. Remodelling of bone and bones: effects of translation and strain on transplants. *Br. J. exp. Path.* 65: 655-670, 1984.
- PRICE T.D. Bones, chemistry and the past of man. En: *The chemistry of prehistoric human bone*. Price T.D. (Ed.). Cambridge Univ. Press, 1989.

- PRICE T.D., SWICK R.W. y CHASE E.P. Bone chemistry and prehistoric diet: strontium studies of laboratory rats. *Am. J. Phys. Anthropol.* 70: 365-375, 1986.
- PRIETO S. Fisiología del hueso. En: J.A. Tresguerres. *Fisiología Humana*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, 1992.
- PRIETO S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: J.A. Tresguerres. *Fisiología Humana*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, 1992.
- PRUMMEL M.F., WIERSINGA W.M., LIPS P., SANDERS G.T.B. y SAUERWEIN H.P. The course of biochemical parameters of bone turnover during treatment with corticosteroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72: 382-389, 1991.
- PRZEKOP F., STUPNICKA E., WOLINSKA-WITORT L., MATEUSIAK K., SADOWSKI B. y DOMANSKI E. Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma cortisol level after prolonged stress in the sheep. *Acta Endocrinologica* 110: 540-545, 1985.
- PUCCIARELLI H.M., DRESSINO V. y NIVEIRO M.H. Changes in skull components of the squirrel monkey evoked by growth and nutrition: an experimental study. *Am. J. Phys. Anthropol.* 81: 535-544, 1990.
- PUCHE R.C. y ROMANO M.C. The effect of dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone on the development of chick embryo frontal bones *in vitro*. *Calcif. Tissue Res.* 2: 133-144, 1968.
- RAINEY W.E., SHAY J.W. y MASON J.L. ACTH induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol biosynthesis and steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 261: 7322-7326, 1986.
- RAMALEY J.A. Effects of dexamethasone before and after puberty on the daily corticosterone rhythm. *Neuroendocrinol.* 17: 203-210, 1975.
- RAMALEY J.A. Effect of ovariectomy on dexamethasone suppression of the adrenal axis in

adult rats. *Neuroendocrinol.* 20: 260-269, 1976.

RAYNAUD J.P., BOUTON M.M., MOGUILEWSKY M., OJASOO T. PHILIBERT D. BECK G. LABRIE F. y MORNON J.P. Steroid hormone receptors and pharmacology. *J. steroid Biochem.* 12: 143-157, 1980.

REHULKA J. Effect of repeated stress and administration of phenobarbital on the lymphoid tissue and on protein metabolism in the lymphocytes on infant and adult rats. *Physiol. Bohemoslov.* 37: 57-65, 1988.

REID I.R. Pathogenesis and treatment of steroid osteoporosis. *Clinical Endocrinology* 30: 83-103, 1989.

RESTREPO C. y ARMARIO A. Chronic stress alters pituitary-adrenal function in prepubertal male rats. *Psychoneuroendocrinology* 12: 393-398, 1987.

REUL J.M.H.M. y de KLOET E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511, 1985.

REUL J.M.H.M., VAN DEN BOSCH F.R. y de KLOET E.R. Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45: 407-412, 1987.

RIESENFELD A. The effect of environmental factors on tooth development: an experimental investigation. *Acta Anatomica* 77: 188-215, 1970.

RIESENFELD A. Compact bone changes in cold-exposed rats. *Am. J. Physiol. Anthropol.* 44: 111-112, 1976.

RIGGS B.L., JOWSEY J., GOLDSMITH R.S., KELLY P.J., HOFFMAN D.L. y ARNAUD C.D. Short and long-term effects of estrogen and synthetic anabolic hormone in postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Invest.* 51: 1659-1663, 1972.

RITTMASER R.S., CUTLER G.B., GOLD P.H.W., BRANDON D.D., TOMAI T.T.,

- LORIAUX D.L. y CHROUSOS G.P. The relationship of saline-induced changes in vasopressin secretion to basal and corticotropin-releasing hormone-stimulated adrenocorticotropin and cortisol secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 371-376, 1987.
- RIVIER C. y PLOTSKY P.M. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 475-494, 1986.
- RIVIER C. y VALE W. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology* 121: 1320-1328, 1987.
- ROSSINI G.P. Glucocorticoid receptors are associated with particles containing DNA and RNA *in vivo*. *Biochemistry Biochem. Res. Com.* 147: 1188-1193, 1987.
- RUFF C.B. y JONES H.H. Bilateral asymmetry in cortical bone thickness of the humerus and tibia-Sex and age factors. *Hum. Biol.* 53: 69-86, 1981.
- RÜS B.J., KRABBE S., CHRISTIANSEN C., CATHERWOOD B. y DEFTOS L. Bone turnover in male puberty: a longitudinal study. *Calcif. Tissue Int.* 37: 213-217, 1985.
- RUSZLER P.L., BEANE W.L. y WOLFORD J.H. Corticosterone vs feed withdrawal for weight loss control when force resting layers. *Poult. Sci.* 63(suppl. 1): 173-174, 1984.
- SAEZ J.M., BEGEOT M. y DURAND P. Récepteurs de l'ACTH. *Annales d'Endocrinologie* 50: 409-417, 1989.
- SAFFRAN M. y SCHALLY A.V. Release of corticotropin by anterior pituitary tissue *in vitro*. *Can. J. Biochem. Physiol.* 33: 408-415, 1955.
- SAFFRAN M., SCHALLY A.V. y BENFEY B.G. Stimulation of the release of corticotropin from the adenohipophysis by a neurohipophysial factor. *Endocrinology* 57: 439-444, 1955.

- SAITO S., NGAN P., ROSOL T., SAITO M., SHIMIZU H., SHINJO N., SHANFELD J. y DAVIDOVITCH Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 β on bone resorption. *J. Dent. Res.* 70: 27-33, 1991.
- SANDY J.R., FARNDAL R.W. y MEIKLE M.C. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 103: 212-222, 1993.
- SANDY J.R., MEGHJI S., FARNDAL R.W. y MEIKLE M.C. Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1010: 265-269, 1989.
- SAPOLSKY R.M. El estrés en los animales. *Investigación y Ciencia* 162: 68-75, 1990.
- SAPOLSKY R.M. y DONNELLY T.M. Vulnerability to stress-induced tumor growth increases with age in rats: role of glucocorticoids. *Endocrinology* 117: 662-665, 1985.
- SAPOLSKY R.M., KREY L.C. y McEWEN B.S. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6174-6177, 1984.
- SAPOLSKY R.M., KREY L.C. y McEWEN B.S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7: 284-301, 1986.
- SARRIEAU A., VIAL M., McEWEN B., BROER Y., DUSSAILLANT M., PHILIBERT D., MOGUILEWSKY M. y ROSTENE W. Corticosteroids receptors in rat hippocampal sections: effect of adrenalectomy and corticosterone replacement. *J. steroid Biochem.* 24: 721-724, 1986.
- SATO Y., ANDO K., OGATA E. y FUJITA T. High potassium diet attenuates salt-induced acceleration of hypertension in SHR. *Am. J. Physiol.* 260 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 29): R21-R26, 1991.
- SATTERLEE D.G. y JHONSON W.A. Selection of Japanese quail for contrasting blood

corticosterone response to immobilization. *Poult. Sci.* 67: 25-32, 1988.

SATTERLEE D.G. y ROBERTS E.D. The influence of stress treatment on femur cortical bone porosity and medullar bone status in japanese quail selected for high and low blood corticosterone response to stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 3: 401-405, 1990.

SATTERLEE D.G., TRAUUX R.E., JACOBS-PERRY L.A. y JOHNSON W.A. Genetic selection of wild-type Japanese quail for high and low plasma corticosterone response to albino quail intrusion. *Poult. Sci.* 61: 1394-1395 (abstrac), 1982.

SAUNDERS S.R. y MAYHALL J.T. Fluctuating asymmetry of dental morphological traits: new interpretations. *Hum. Biol.* 54: 789-799, 1982.

SCHLEIFFER R., PERNOT F., BERTHELOT A. y GAIRARD A. Low calcium diet enhances development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exper. Hypertension* 6: 783-794, 1984.

SCHNEIDER W.C. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzimol. Academic Press* 3: 680-685, 1957.

SCHÜLE R., MULLER M., KALTSCHMIDT CH. y RENKAWITZ R. Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242: 1418-1420, 1988.

SCIULLI P.W., DOYLE W.J., KELLEY C., SIEGEL P. y SIEGEL M.I. The interaction of stressors in the induction of increased levels of fluctuating asymmetry in the laboratory rat. *Am. J. Phys. Anthropol.* 50: 279-284, 1979.

SEEMAN E. Osteoporosis in men: epidemiology, pathophysiology, and treatment possibilities. *Am. J. Med.* 95(suppl. 5A): 22S-28S, 1993.

SELYE H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 2:138, 1936.

SELYE H. The significance of the adrenals for adaptation. *Science* 85: 247, 1937.

- SELYE H. The general adaptation syndrome and the disease of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6: 117-121, 1946.
- SELYE H. Non specific resistance. *Ergeb. Pathol.* 41: 208-241, 1961.
- SELYE H. The evolution of the stress concept. Stress and cardiovascular disease. En: Levy L. *Society, stress and diseases*. Oxford University Press. London, 1971.
- SELYE H. The evolution of the stress concept. *Am. Sci.* 61: 692-699, 1973.
- SELYE H. On the real benefits of eustress. Interview by Laurence Cherry. *Physiol. Today* 60-70, 1978.
- SEMAFUKO. W.E.B. y MORRIS D.J. Effect of high calcium diet on the development of high blood pressure in intact spontaneously hypertensive rats and in adrenalectomized spontaneously hypertensive rats treated with aldosterone. *Steroids* 56: 131-135, 1991.
- SHAW J.H. Marginal protein deficiency during the reproductive cycle in rats: influence in body weight and development of skulls and teeth of offspring. *J. Dent. Res.* 49: 350-359, 1970a.
- SHAW J.H. Preeruptive effects of nutrition on teeth. *J. Dent. Res.* 49: 1238-1250, 1970b.
- SIEGEL H.S. Blood cells and chemistry of young chickens during daily ACTH and cortisol administration. *Poult. Sci.* 47: 1811-1817, 1968.
- SIEGEL H.S. y LATIMER J.W.Jr. Bone and calcium responses to adrenocorticotropin, cortisol and low environmental temperature in young chickens. *Proc. 14th World's Poultry Cong.* 2: 453-463, 1970.
- SIEGEL M.I. y DOYLE W.J. The differential effects of prenatal and postnatal audiogenic stress on fluctuating dental asymmetry. *J. Exp. Zool.* 191: 211-214, 1975a.

- SIEGEL M.I. y DOYLE W.J. The effects of cold stress on fluctuating asymmetry in the dentition of the mouse. *J. Exp. Zool.* 193: 385-389, 1975b.
- SIEGEL M.I., DOYLE W.J. y KELLEY C. Heat stress, fluctuating asymmetry and prenatal selection in the laboratory rat. *Am. J. Physiol. Anthropol.* 46: 121-126, 1977b.
- SIEGEL P., SIEGEL M.I., KRIMMER E.C., DOYLE W.J. y BARRY H. Fluctuating dental asymmetry as an indicator of the stressful prenatal effects of delta-nine tetrahydrocannabinol in the laboratory rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42: 339-334, 1977a.
- SIEGEL M.I. y SMOOKLER H.H. Fluctuating dental asymmetry and audiogenic stress. *Growth* 37:35-39, 1973.
- SKINNER B.F. *La conducta de los organismos*. Ed. Fantanella. Barcelona, 1975.
- SMITH D.A.S. y WALKER M.S. Changes in plasma steroids and bone density in Klinefelter's syndrome. *Calcif. Tissue Res. Suppl* 22: 225-228, 1977.
- SMYTHE G.A., BRADSHAW J.E. y VINING R.F. Hypotalamic monoamine control of stress-induced adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinol.* 113: 1062-1071, 1983.
- SOFAER J.A., BAILIT H.L. y MACLEAN C.J. A developmental basis for differential tooth reduction during hominid evolution. *Evolution* 25: 509-517, 1971.
- SOKAL R. y ROHLF F.J. *Biometría*. Ed. H. Blume, 1979.
- SÖMJEN D., HARELL A., JACCARD N., WEISMAN Y. y KAYE M. Reciprocal modulation by sex steroid and calciotrophic hormones of skeletal cell proliferation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 37: 491-499, 1990.
- SPINEDI E., HERRERA L. y CHISARI A. Angiotensin II (AII) and adrenocorticotropin release: modulation by estradiol of the AII biological activity and binding

- characteristics in anterior pituitary dispersed cells. *Endocrinology* 23: 641-646, 1988.
- SPSS. *Statistical Package for the Social Sciences*. Versión 2.0. Paquete estadístico para PC compatibles, 1989.
- STALEY R.N., BISHARA S.E., HANSON J.W. y NOWAK A.J. Craniofacial development in myotonic dystrophy. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 29: 456-462, 1992.
- STANGL D., PFOHL B., ZIMMERMAN M., CORYELL W. y CORENTHAL C. The relationship between age and post-dexamethasone cortisol: a test of three hypotheses. *J. Affect. Disord.* 11: 185-197, 1986.
- STEPANOVIC S., NIKOLIC I., VARAGIC V.M. y JOZANOV O. Cholinergic and anticholinergic influences on the plasma catecholamine response to forced immobilization stress in rats. *Ingoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 24: 375-381, 1988.
- STOREY E. Cortisone induce bone resorption in the rabbit. *Endocrinol.* 68: 533-542, 1961.
- STOREY E. y FEIK S.A. Remodelling of bone and bones: effects of altered mechanical stress on caudal vertebrae. *J. Anat.* 140: 37-48, 1985.
- SUAREZ B.T. Neandertal dental asymmetry and the probable mutation effect. *Am. J. Phys. Anthropol.* 41: 411-416, 1974.
- SUZUKI Y., ICHIKAWA Y., SAITO E. y HOMMA M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism* 32: 151-6, 1983.
- TEITELBAUM S.L., MALONE J.D. y KAHN A.J. Glucocorticoid enhancement of bone resorption by rat peritoneal macrophages *in vitro*. *Endocrinology* 108: 795-799, 1981.
- TENCZAR P. y BADER R.S. Maternal effect in dental traits of the house mouse. *Science* 152: 1398-1400, 1966.

- THAKORE J.H. y DINAN T.G. Dexamethasone-induced growth hormone release: a dose-response study. *Human psychopharmacology* 8: 285-288, 1993.
- TIENRUNGROJ W., SANCHEZ E.R., HOUSLEY P.R., HARRISON R.W. y PRATT W.B. Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation, and DNA binding. *J. Biol. Chem.* 262: 17342-17349, 1987.
- TILDERS F., BERKENBOSCH F., VERMES I., LINTON E. y SMELIK P. Role of epinephrine and vasopressin in the control of the pituitary-adrenal response to stress. *Fed. Proc.* 14: 155-160, 1985.
- TOBIAS J. y CHAMBERS T.J. Glucocorticoids impair bone resorptive activity and variability of osteoclast disaggregated from neonatal rat long bones. *Endocrinology* 125: 1290-1295, 1989.
- TRANCHANT C., BRAUN S. y WARTER J.M. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes: rôle des lipocortines. *Rev. Neurol. (Paris)* 145: 813-818, 1989.
- TROTTER M. y GLEESER G.C. A re-evaluation of estimation of stature based on measurements of stature taken during life and of long bones after death. *Am. J. Phys. Anthropol.* 16: 79-123, 1958.
- TURNER R.T., EVANS G.L. y WAKLEY G.K. Mechanism of action of estrogen on cancellous bone balance in tibiae of ovariectomized growing rats: inhibition of indices of formation and resorption. *J. Bone Miner. Res.* 8: 359-366, 1993.
- TURNER R.T., COLVARD D.S. y SPELSBERG T.C. Estrogen inhibition of periosteal bone formation in rat long bones: down-regulation of gene expression for bone matrix proteins. *Endocrinology* 127: 1346-1351, 1990.
- TURNER R.T., VANDERSTEENHOVEN J.J. y BELL N.H. The effects of ovariectomy and 17 β - estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J. Bone Miner. Res.* 2: 115-112, 1987.

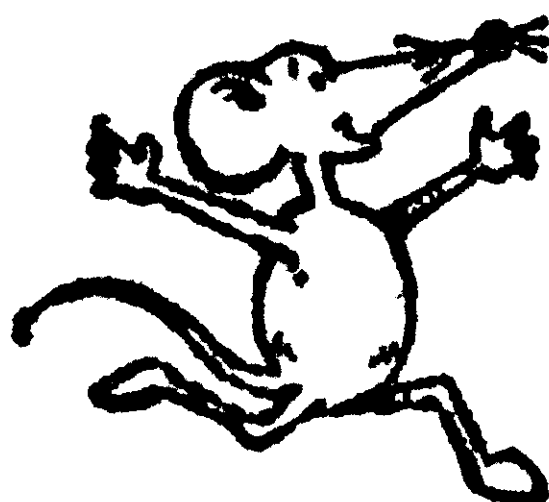
- TUUKKANEN J., WALLMARK B., JALOVAARA P., TAKALA T., SJÖGREN S. y VÄÄNÄNEN K. Changes induced in growing rat bone by immobilization and remobilization. *Bone* 12: 113-118, 1991.
- URIST M.R. y DEUTSCH N.M. Effects of cortisone upon blood, adrenal cortex, gonads, and the development of osteoporosis in birds. *Endocrinol.* 66: 805-818, 1960a.
- URIST M.R. y DEUTSCH N.M. Influence of ACTH upon avian species and osteoporosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 35-39, 1960b.
- VALE W., SPIESS J., RIVIER C. y RIVIER J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* 213: 1394-1397, 1981.
- VALENTI G., BANCHINI A., DENTI L., POLOTTI R. y CEDA G.P. ACTH 1-17 stimulates GH pituitary secretion in humans. *J. Endocrinol. Invest.* 9: 165-169, 1986.
- VAN EEKELEN J.A.M., JIANG W., DEKLOET E.R. y BOHN M.C. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 21: 88-94, 1988.
- VAN VALEN L. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16: 125-142, 1962.
- VELASCO J.A. *Influencia del estrés crónico y la actividad adrenal sobre la presión arterial y la gestación*. Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid, 1990.
- VELASCO J., ALARIO P., GAMALLO A. y TRANCHO G.J. Blood pressure elevation and pregnancy alterations by dexamethasone and ACTH administration in female rats. *J. steroid Biochem.* 36: 48S, 1990.
- VELASCO A., LORENZO P., SERRANO J.S. y ANDRES-TRELLES F. *Velázquez. Farmacología*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, 1993.
- VILLANUA A. y GAMALLO A. Radioinmunoanálisis de corticosterona para la valoración

- de la función adrenal en ratas como índice de estrés. *Endocrinología* 32: 213-217, 1985.
- VUGEL V.H. Coping, stress, stressors and health consequences. *Neuropsychobiology* 13: 129, 1985.
- WALLACE J.L. Glucocorticoid-induced gastric mucosal damage: inhibition of leukotriene, but not prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* 34: 311-323, 1987.
- WEISS J.M. Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosom. Med.* 32: 397, 1968.
- WEHRENBURG W.B., BERGMAN P.J., STAGG L., NDON J. y GUÍSTINA A. Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with somatostatin antibodies. *Endocrinology* 127: 2705-2708, 1990a.
- WEHRENBURG W.B., JANOWSKI B., PIERING A.W., CULLER F. y JONES K.L. Glucocorticoids: potent inhibitors and stimulators of growth hormone secretion. *Endocrinology* 126: 3200-3203, 1990b.
- WILLIAMS C.L., PETERSON J.M., VILLAR R.G. y BURKS T.F. Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress. *Am. J. Physiol.* 253 (*Gastrointest. Liver Physiol.* 16): G582-G586, 1987.
- WILLIAMS P.L. y WARWICK R. Osteología. En: *Gray Anatomía*. Tomo I. Salvat Editores, S.A. Barcelona, 1985.
- WHITWORTH J.A. Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Kidney International* 31: 1213-1224, 1987.
- WLODARSKI K.H. y KOBUS M. Association of giant multinucleated cells with deterioration of osteoinductive potency of bone matrix. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 40: 83-87, 1992.

WON J.G.S., JAP T.S., CHANG S.C., CHING K.N. y CHIANG B.N. Evidence for a delayed, integral, and proportional phase of glucocorticoid feedback on ACTH secretion in normal human volunteers. *Metabolism* 35: 254-259, 1986.

WRONSKI T.J. y MOREY E.R. Skeletal abnormalities in rats induced by simulated weightlessness. *Bone Dis. Relat. Res.* 4: 69-75, 1982.

YEH K.Y. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallel changes after induced stress. *Endocrinol.* 115: 1364-1370, 1984.



MJ